

CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN (CEA),
NONSPECIFIC CROSSREACTING ANTIGEN (NCA) UND
TISSUE POLYPEPTIDE ANTIGEN (TPA) BEI
KOLOREKTALEN KARZINOMEN
- EINE IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG -

Reinhart Schlüppel

1985

*Liss
München*



Aus dem Pathologischen Institut der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. M. Eder

CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN (CEA), NONSPECIFIC CROSS-
REACTING ANTIGEN (NCA) UND TISSUE POLYPEPTIDE ANTI-
GEN (TPA) BEI KOLOREKTALEN KARZINOMEN -
Eine immunhistochemische Untersuchung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Reinhart Schüppel
aus
München

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr.B. Wiebecke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Eder

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Februar 1986

Meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547927_0014

INHALTSVERZEICHNIS:

Seite:

1.	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG:.....	5
2.	TUMORASSOZIIERTE ANTIGENE.....	8
	2.1. Carcinoembryonic Antigen (CEA).....	8
	2.2. Nonspecific Crossreacting Antigen (NCA).....	10
	2.3. Biliary Glycoprotein (BGP).....	11
	2.4. Tissue Polypeptide Antigen (TPA)	12
3.	MATERIAL UND METHODEN:.....	13
	3.1. Untersuchungsmaterial.....	13
	3.2. Das Prinzip der indirekten Immunperoxidase (IPO)-Technik.....	13
	3.3. Durchführung der indirekten Peroxidase-methode...	15
	3.3.1. Vorbereitung.....	15
	3.3.2. Vorbehandlung mit Protease.....	15
	3.3.3. Blockade der endogenen Peroxidase.....	16
	3.3.4. Reduktion der Hintergrundreaktion.....	16
	3.3.5. Erster Antikörper.....	16
	3.3.6. Zweiter Antikörper.....	17
	3.3.7. Spezifische Farbreaktion.....	17
	3.3.8. Kerngegenfärbung.....	18
	3.3.9. Eindecken.....	18
	3.4. Antiseren.....	18
	3.4.1. Normales Ziegenserum (NZS).....	18
	3.4.2. Anti-Carcinoembryonic Antigen (aCEA).....	18
	3.4.2.1. Absorption von aCEA-Dako.....	20
	3.4.2.2. Optimale Verdünnung von aCEA-abs und aCEA-Dako.....	20

3.4.3. Anti-Nonspecific Crossreacting Antigen (aNCA).....	20
3.4.4. Anti-Biliary Glycoprotein (aBGP).....	21
3.4.5. Anti-Tissue Polypeptide Antigen (aTPA).....	22
3.4.6. Peroxidase gekoppeltes anti-Kaninchen- Immunglobulin (PO).....	22
3.5. Kontrollen.....	22
3.6. Serumspiegel von CEA.....	23
3.7. Tumorklassifikation.....	24
3.8. Auswertungskriterien Immunhistochemie.....	24
3.9. Flächen- und Umfangsmessungen.....	25
3.10. Statistische Auswertung.....	27
4. ERGEBNISSE:.....	29
4.1. Spezifität der Antiseren.....	29
4.1.1. aCEA und kreuzreagierende Antikörper.....	29
4.1.2. aBGP.....	30
4.2. CEA.....	35
4.2.1. Normale Mukosa.....	35
4.2.2. An den Tumor angrenzende gesunde Schleimhaut ("adjacent mucosa").....	36
4.2.3. Karzinome.....	36
4.2.3.1. Allgemeine Beobachtungen.....	36
4.2.3.2. Reaktionsintensität.....	38
4.2.3.3. Reaktionstypen.....	40
4.2.3.4. Extrazelluläres CEA.....	42
4.2.4. Immunhistochemie und Serumspiegel.....	48
4.2.5. Immunhistochemie und Durchflußzytometrie.....	50
4.3. NCA.....	52
4.3.1. Normale Mukosa.....	52
4.3.2. An den Tumor angrenzende gesunde Schleimhaut ("adjacent mucosa").....	52
4.3.3. Karzinome.....	52

4.3.3.1. Reaktionstypen.....	53
4.3.3.2. Reaktionsintensität.....	55
4.4. TPA.....	58
4.4.1. Normale Mukosa.....	58
4.4.2. An den Tumor angrenzende gesunde Schleimhaut ("adjacent mucosa").....	59
4.4.3. Karzinome.....	60
4.4.3.1. Allgemeine Beobachtungen.....	60
4.4.3.2. Reaktionsintensität.....	60
4.4.3.3. Reaktionstypen.....	64
4.4.3.4. TPA außerhalb von Tumorzellen.....	67
4.5. Tumorassoziierte Antigene im Vergleich.....	69
5. DISKUSSION.....	73
5.1. Darstellung von kolorektalen Karzinomen mit der indirekten Immunperoxidase-Technik.....	73
5.2. Gesunde Kolonmukosa.....	75
5.3. Adjacent mucosa.....	77
5.4. Karzinome.....	77
5.5. CEA-Immunhistochemie und CEA-Serumspiegel.....	83
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	87
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	91

Verzeichnis der Abkürzungen

aCEA	anti-CEA-Antiserum
aBGP	anti-BGP-Antiserum
aNCA	anti-NCA-Antiserum
aTPA	anti-TPA-Antiserum
AEC	3-Amino-9-Äthyl-Carbazol
BGP	Biliary Glycoprotein
CEA	Carcinoembryonic Antigen
CEA-abs	CEA der Firma Dakopatts, absorbiert
CEA-Dako	CEA der Firma Dakopatts, unabsorbiert
CNBr	Cyanbromid
DMSO	Dimethylsulfoxid
G 1	hoch differenziert
G 2	mäßig differenziert
G 3	gering differenziert
HE	Hämatoxilin/Eosin
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IPO	Indirekte Immunperoxidase-Methode
MG	Molekulargewicht
NCA	Nonspecific Crossreacting Antigen
NCA-2	Nonspecific Crossreacting Antigen 2
n.s.	nicht signifikant
NZS	Normales Ziegenserum
PBS	Phosphate Buffered Saline
PO	Peroxidase-gekoppelter Antikörper
RIA	Radioimmuno Assay
TPA	Tissue Polypeptide Antigen
TPA: B ₁	Tissue Polypeptide Antigen, Untereinheit B ₁
ZN-Areale	Zellfrei-nekrotische Areale

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Tumormarker haben heute in der Onkologie eine zentrale Stellung erlangt. Bei den Tumormarkern handelt es sich um eine "heterogene Gruppe von Hormonen, Enzymen und anderen Substanzen, die entweder von Tumorzellen produziert werden oder deren Produktion durch das maligne Wachstum stimuliert wird" (v.Kleist 1983).

Schon früh in diesem Jahrhundert wiesen etwa Hirschfeld und Mitarbeiter (1932) auf einen besonderen Aspekt der Tumorummunologie hin: embryonales und malignes Gewebe enthalten verwandte Strukturen.

Erst in den 50er und 60er Jahren brachte diese Erkenntnis dann praktische Ergebnisse. Zunächst beschrieb Björklund (1956) ein Antigen, genannt "tissue polypeptide antigen" (TPA), welches er aus Tumoren verschiedenen Organursprungs gewann. Abelev konnte später (1963) zeigen, daß ein Glykoprotein (α -Fetoprotein) nur bei Föten und Trägern von Lebertumoren nachzuweisen war, nicht aber bei gesunden Erwachsenen. Schließlich fanden Gold und Freedman (1965) das "carcinoembryonic antigen" (CEA), das ebenfalls nur bei Kolonkarzinompatienten und Föten und nicht bei erwachsenen Gesunden vorkam.

Diese Substanzen gehören einer Gruppe an, die man heute als karzinofötale Antigene (v.Kleist 1983) zusammenfaßt. Nach einer Phase großer Erwartungen und vielversprechender erster Ergebnisse mußte aber der Anspruch "krebsspezifische" Substanzen gefunden zu haben, im Lichte weiterer Forschungsergebnisse aufgegeben werden.

Bisher jedenfalls konnte noch keine Substanz isoliert werden, die ausschließlich in malignem Gewebe vorkommt. Die Unterschiede zwischen gut- und bösartigem Gewebe scheinen eher quantitativer als qualitativer Art zu sein.

Als Bezeichnung für die Gruppe der sogenannten Tumormarker, sollte deshalb eher der Begriff "tumorassoziierte Antigene" allgemeine Verwendung finden (v.Kleist 1983), sofern sie immunologische Prozesse auslösen.

Die Untersuchung tumorassoziiierter Antigene bei kolorektalen Karzinomen erscheint aus mehreren Gründen berechtigt:

Kolorektale Karzinome stehen in der Bundesrepublik in der Krebsmortalitätsstatistik bei Männern an der dritten, bei Frauen an der ersten Stelle der Todesursachen sowie insgesamt an der zweiten Stelle der Karzinominzidenzen überhaupt (Eder 1978).

Da die Inzidenz der kolorektalen Karzinome laufend weiter zunimmt, ist jede Information über diese Krankheit wichtig für eine steigende Zahl von Patienten.

CEA hat seine Hauptbedeutung bei Dickdarmkarzinomen. Es liegt heute eine große Zahl von Publikationen vor, die sich mit klinischen Aspekten der Tumorantigene befaßt. Die morphologische Seite ist aber bisher insgesamt zu kurz gekommen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb folgende Fragestellungen zu untersuchen:

1. Gibt es einen Zusammenhang zwischen histopathologischen und immunhistochemischen Tumoreigenschaften bei kolorektalen Karzinomen?
2. Gibt es einen Zusammenhang zwischen präoperativen Serumspiegeln von CEA und immunhistochemischen Befunden?

Da bei Aussagen zu CEA kreuzreagierende Antigene eine entscheidende Bedeutung besitzen, wurde das wichtigste immunologisch verwandte Antigen zu CEA untersucht, mit der Frage:

3. Unterscheiden sich CEA und NCA (nonspecific cross-reacting antigen) in ihrem immunhistochemischen Verhalten?

Schließlich wurde ein mit CEA und NCA immunologisch nicht verwandtes Antigen untersucht:

4. Kann TPA als nicht mit CEA und NCA assoziiertes Antigen das diagnostische Spektrum bei kolorektalen Karzinomen erweitern?

2. TUMORASSOZIIERTE ANTIGENE

2.1. Carcinoembryonic Antigen (CEA)

1965 stellten Gold und Freedman ein Glykoprotein vor, welches sie nur in Kolonkarzinomextrakten (bzw. deren Lebermetastasen) und in embryonalen Geweben nachweisen konnten. Sie bezeichneten es daher als "carcinoembryonic antigen" (CEA).

Heute ist CEA in fast allen normalen Geweben entodermaler Herkunft nachgewiesen (v.Kleist 1983), die Bezeichnung des Antigens wurde aber beibehalten.

Das Vorkommen von CEA in gesunder Dickdarmmukosa wurde zunächst bestritten (Gold und Freedman 1965, Denk et al. 1972), ist aber später mehrfach bestätigt worden (Martin et al. 1972, Bordes et al. 1973, Huitric et al. 1976). Die Antigenexpression beginnt im Embryonalstadium mit einem Maximum in der Fetalzeit. Sie bleibt dann von der Neonatalperiode bis zum Erwachsenenalter etwa gleich (Dyce und Haverback 1974, Gadler et al. 1980, Wagener et al. 1983).

Unter den Malignomen sind vor allem die Karzinome CEA-positiv. Kolonkarzinome enthalten dabei die höchsten Mengen an CEA. Werte bis zu 20.000 ng/g Gewebe wurden hier gefunden (normale Mukosa: 50 - 150 ng/g Gewebe) (Khoo et al. 1973, Dyce und Haverback 1974).

CEA übersteht eine Routineaufarbeitung mit Formolfixierung und Paraffineinbettung ohne größere Verluste an antigenem Material (Isaacson und LeVann 1976).

Bei normalen und Tumorzellen ist CEA sowohl im Zytoplasma (Herberman et al. 1975, Huitric et al. 1976, Ahnen et al. 1982) als auch in der Zellmembran (Gold et al. 1968 und 1970, Wagener et al. 1978) nachzuweisen, wobei man annimmt, daß CEA im Golgi-Apparat gebildet wird, zur Zellmembran transportiert und dann in die Umgebung abgegeben

wird. Dabei reichert es sich wahrscheinlich in der Glykokalix an (Huitric et al. 1976).

Die immunologischen Eigenschaften von CEA werden durch den Proteinanteil des Moleküls (MG 180.000) determiniert (Coligan et al. 1975, Hammarström et al. 1976), er ist bei CEA-Extrakten aus verschiedenen Organumoren und aus normaler Mukosa gleich (Coligan et al. 1973, Rogers et al. 1975, Fritsche und Mach 1977, Dent et al. 1980).

Immunologische Gemeinsamkeiten gibt es für CEA mit

- Blutgruppensubstanz A des ABO-Systems (Alastair et al. 1973)
- Nonspecific crossreacting antigen (Mach und Pusztaszeri 1972)
- Nonspecific crossreacting antigen 2 (Burtin et al. 1973 a) und
- Biliary glycoprotein (Svenberg 1976).

Untersuchungen mit CEA müssen mit Antiseren durchgeführt werden, die nicht mit den oben erwähnten Substanzen kreuzreagieren.

Die Obergrenze der Serumnormalwerte von CEA bei Gesunden beträgt je nach Methode 2,5 bis 20 ng/ml (Lamerz und Fateh-Moghadam 1975).

Leicht erhöhte Werte können bei Rauchern und Patienten mit entzündlichen Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts gefunden werden (Hansen et al. 1974, Booth et al. 1974, Zamcheck 1975, Meryn et al. 1983).

Beim kolorektalen Karzinom sind je nach Studie und Tumorstadium präoperativ 14 bis 86 % der Patienten serologisch positiv (Übersichten bei Zamcheck 1980 und v.Kleist 1983).

Die gegenwärtige Bedeutung der Bestimmung des CEA-Serumspiegels liegt weniger in der Aufdeckung unerkannter Karzinomfälle, als vielmehr in der Überwachung nach Therapie, wobei nur bei postoperativ sinkenden Werten von einem kurativen Eingriff gesprochen werden kann (Herrera et al. 1976 Goldenberg et al. 1981, Wagener 1983).

2.2. Nonspecific Crossreacting Antigen (NCA)

NCA ist das wichtigste mit CEA kreuzreagierende Antigen. Von einer Vielzahl von Autoren ist es unter verschiedenen Namen beschrieben worden (Übersicht bei Lamerz und Fateh-Moghadam 1975). Das Molekulargewicht beträgt 60.000 (v. Kleist 1983).

Unter physiologischen Verhältnissen ist NCA in Lunge, Leber, Milz und Kolon zu finden (Darcy et al. 1973, v. Kleist 1973, Orjasaeter 1974). Besonders hinzuweisen ist auf die Anwesenheit von NCA in neutrophilen Granulozyten und z.T. auch in Makrophagen (Burtin et al. 1975, Wahren et al. 1980 und 1982).

In Kolonkarzinomen ist das Vorkommen von NCA in Tumorextrakten ebenfalls beschrieben (Darcy et al. 1973). Die zelluläre Verteilung von NCA ähnelt der von CEA (v. Kleist 1973).

Von CEA läßt sich NCA aber durch das Molekulargewicht (Newmann et al. 1974), durch das exklusive Vorkommen von Methionin bei NCA (Tuberville et al. 1973) und vor allem durch das immunologische Verhalten unterscheiden (Abb. 1). Neben einem beiden Molekülen gemeinsamen Teil gibt es noch spezifische Epitope, die nur bei CEA bzw. NCA nachzuweisen sind (Darcy et al. 1973, Tuberville et al. 1973, Newmann et al. 1974).

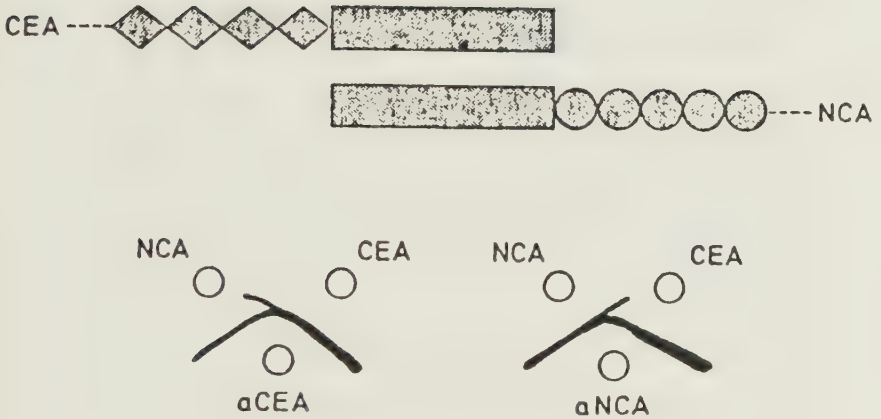


Abb.1: Teilidentität von CEA und NCA.
Untere Bildhälfte: Ouchterlonytest.
Obere Bildhälfte: Schematische Darstellung der beiden Moleküle. Das Rechteck symbolisiert den gemeinsamen Anteil beider Moleküle. Raute und Kreis sind spezifische Strukturen von CEA bzw. NCA (aus v. Kleist et al. 1972).

2.3. Biliary Glycoprotein (BGP)

Dieses ebenfalls mit CEA kreuzreagierende Antigen wurde 1976 von Svenberg beschrieben. Er konnte es in den Gallenkapillaren, im Lumen der Gallengänge und in der Gallenblasenmukosa nachweisen. Die Reaktion von Kolonmukosa war nur schwach (Svenberg et al. 1979).

2.4 Tissue Polypeptide Antigen (TPA)

TPA wurde 1956 von Björklund durch Immunisierung eines Pferdes mit einer Mischung von verschiedenen Organatumor-extrakten produziert. Es ist ein reines Polypeptid ohne jede prothetische Gruppe (Lüning et al. 1980).

Auch diese Substanz stellt keinen echten "Tumormarker" dar, sondern kommt in allen nichtepidermalen epithelialen Zellen vor (Nathrath et al. 1985). Auch bei Karzinomen dieser Gewebe wurde TPA beschrieben (Björklund und Björklund 1979, Nathrath et al. 1985). Eine immunhistochemische Studie an Kolonkarzinomen liegt bisher nicht vor.

Die Bedeutung von TPA war lange unklar, bis Hinweise dafür gefunden werden konnten, daß TPA mit dem Zytoskelett assoziiert ist (Björklund und Björklund 1983). Sehr wahrscheinlich handelt es sich bei TPA um ein Protein der Zytokeratingruppe (Weber et al. 1984).

TPA liegt sowohl im Zytoplasma als auch in der Zellmembran (Björklund und Björklund 1979).

TPA kann chemisch in drei Polypeptidketten zerlegt werden: TPA: B₁, TPA: B₂ und TPA: C. Verantwortlich für die immunologischen Eigenschaften von TPA ist die Untereinheit TPA: B₁ (Lüning et al. 1980, Wiklund et al. 1981). Sie hat ein Molekulargewicht von 43.000 (Björklund 1981). Eine immunologische Verwandtschaft zu CEA besteht nicht.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Untersuchungsmaterial

65 Operationspräparate kolorektaler Karzinome aus dem Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München aus den Jahren 1981 bis 1983 wurden untersucht. Sie wurden zufällig ausgewählt. Bei 33 Fällen war ein präoperativer Serumspiegel bekannt. Bei 29 Fällen existierte eine simultane Messung der CEA-Antigendichte mit der Durchflußzytometrie (Wirsching 1984).

Als Repräsentant der gesunden Mukosa wurde jeweils der orale Resektionsrand der Präparate ausgewertet. Alle Resektate wurden postoperativ in 10 % -igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

3.2. Das Prinzip der indirekten Immunperoxidase (IPO)-Technik

Alle 65 Präparate wurden immunhistochemisch nach dem Prinzip der indirekten Immunperoxidase angefärbt.

Die zugrunde liegende Idee ist, daß zunächst eine Antigen/Antikörperreaktion stattfindet, die dann mittels optischer Markierung im Mikroskop ausgewertet werden kann.

Die indirekte Immunperoxidase-Technik (Nakane und Pierce 1966, Burns 1975, Heyderman und Neville 1977, Taylor 1978) arbeitet mit zwei verschiedenen Antikörpern: Der erste richtet sich gegen das nachzuweisende Antigen, ist aber noch nicht unmittelbar sichtbar. In einer zweiten Reaktion binden sich enzybeladene Antikörper (im vorliegenden Fall: Peroxidase-gekoppelte Antikörper) an den ersten Antikörper, der diesen als Antigen dient. Mittels farbigem Substrat (hier: 3-Amino-9-Äthyl-Carbazol) wird der zweite Antikörper sichtbar gemacht (Abb.2). Damit wird nun schließlich auch das eigentlich interessierende An-

tigen nachgewiesen.

Die IPO-Technik liefert im Vergleich zu anderen immunologischen Techniken sehr gute Ergebnisse (Sharkey et al. 1980), ihre zuverlässige Handhabbarkeit rechtfertigt ihre weite Verbreitung (Primus et al. 1978, Sternberger 1979, Sharkey et al. 1980).

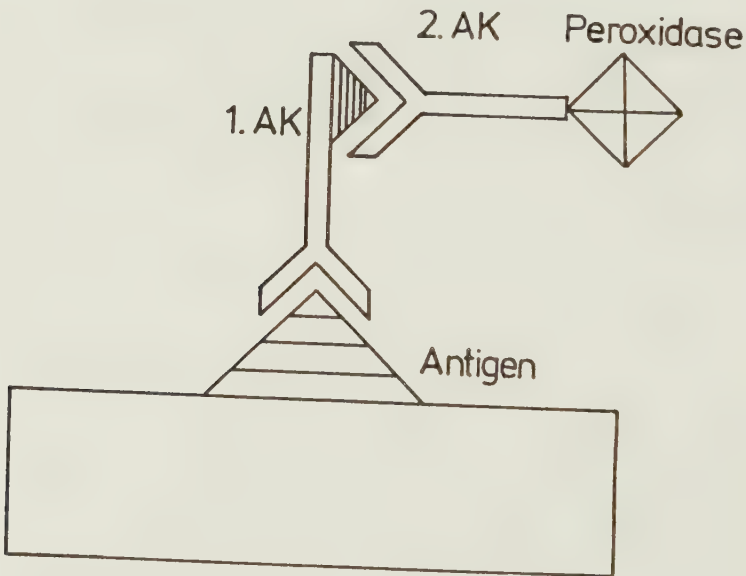


Abb. 2: Prinzip der indirekten Immunperoxidase. Das Dreieck stellt das nachzuweisende Antigen dar. Der erste Antikörper (1.AK) bindet sich an das Antigen. Der zweite, enzymgekoppelte Antikörper (2. AK) läßt sich mit einer farbigen Enzymreaktion nachweisen. (Im vorliegenden Versuch: 1.AK: Kaninchen-IgG, 2.AK: Ziegen-IgG-anti Kaninchen)

3.3. Durchführung der indirekten Peroxidasemethode

3.3.1. Vorbereitung

Schnitte von der Dicke $4\text{ }\mu\text{m}$ wurden auf Objektträger aufgezogen, die mit Serunglyzerin beschichtet waren. Anschließend erfolgte eine Trocknung über 12 Stunden bei 60°C .

Das Entparaffinieren erfolgte in Xylol. Eine anschließende absteigende Alkoholreihe schloß mit Aqua dest. ab.

3.3.2. Vorbehandlung mit Protease

Die Fixation der Tumoren mit 10 % Formalin maskiert einen großen Teil der TPA-Gewebsantigene (Björklund und Björklund 1983). Dieser Effekt kann durch Anwendung von Proteasen rückgängig gemacht werden (Huang 1975, Nathrath et al. 1982).

Zu diesem Zweck wurde Pronase (0,1 % in PBS^{*}) 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer verwendet. Anschließend wurden die Schnitte bei 4°C für 60 Minuten in PBS gestellt, wodurch man die Proteasereaktion unterbrechen kann (Witting 1977).

Für die Anfärbbarkeit von CEA, NCA und BGP ergaben eigene Versuche mit Pronasevorbehandlung keine Verbesserung der Reaktion, weshalb bei diesen drei Antigenen auf den Einsatz von Pronase verzichtet wurde.

* Phosphate-buffered-saline (PBS): 0,01 M phosphatgepufferte Kochsalzlösung. Ansatz für 10 l: 85g NaCl, 12,7g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 3,9g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ad 10 l Aqua dest, pH 7,2.

3.3.3. Blockade der endogenen Peroxidase

Um falsch positive Reaktionen, hervorgerufen durch gewebs-eigene Peroxidase, auszuschalten, wurden die Schnitte mit 7,5 % H_2O_2 für zehn Minuten (modifiziert nach Burns 1975 sowie Nathrath und Meister 1982) und 2,28 % Perjodsäure (Heyderman und Neville 1977) für fünf Minuten behandelt. Nach jedem Schritt wurde unter laufendem Leitungswasser für fünf Minuten gespült.

Danach entstandene Aldehydgruppen wurden in 0,02 % Natrium-borhydrid (zwei Minuten) beseitigt (Lillie und Pizzolato 1972).

Anschließend wurden die Präparate 2 x 5 Minuten in PBS gespült.

3.3.4. Reduktion der Hintergrundreaktion

Im vorliegenden Experiment wurde als zweiter Antikörper Immunglobulin von der Ziege eingesetzt. Dieses kann nicht nur Bindungsstellen am ersten Antikörper, sondern auch unspezifische im übrigen Gewebe besetzen. Darum wurden diese Bindungsstellen schon vor dem Aufbringen des ersten Antikörpers mit normalem Ziegenserum (NZS) abgesättigt (Burns 1975). NZS wurde für zehn Minuten bei Raumtemperatur auf die Objektträger aufgebracht (feuchte Kammer). Wieder wurde 2 x 5 Minuten in PBS gespült.

3.3.5. Erster Antikörper

Anti-CEA, aNCA und aBGP blieben jeweils 15 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer auf den Präparaten, aTPA ebenfalls in der feuchten Kammer, aber 30 Minuten bei 37° C.

Die Waschphase beinhaltete dann 2 x 5 Minuten in einer Brij-Lösung (Brij 35-solution: 5 ml 1 %iger Polyoxy-äthylester ad 1000 ml PBS).

3.3.6. Zweiter Antikörper

Da alle spezifischen ersten Antikörper vom Kaninchen stammten, konnte als nächster Schritt für alle Marker derselbe Peroxidase-gekoppelte Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen) verwendet werden.

Die Bedingungen bei der Anwendung waren: 15 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer, Waschvorgang wie nach dem ersten Antikörper.

3.3.7. Spezifische Farbreaktion

Zum Peroxidasenachweis wurde das von Burstone (1960) in die Histochemie eingeführte 3-Amino-9-Äthyl-Carbazol (AEC) verwendet.

Diese Methode ist bei formalin-fixiertem und paraffin-eingebettetem Material weitgehend artefaktfrei und liefert eine dauerhafte Färbung (Graham et al. 1965, Schaefer und Fischer 1968).

ACE dient als chromogener Wasserstoffdonator in der Peroxidasereaktion und ergibt eine rotbraune Anfärbung.

10 mg AEC wurden in 6 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöst, mit 50 ml 0,1 M Michaelispuffer* (pH 7,4) und 5 µl H_2O_2 gemischt und ad 100 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

Die Schnitte blieben 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Lösung.

Nach der Färbephase wurden die Schnitte für 10 Minuten unter Leitungswasser gewaschen.

* 0,1 M Michaelispuffer: 20,6 g 5,5-Diäthylbarbitursäure-Natriumsalz ad 1000 ml Aqua dest., pH 7,4.

3.3.8. Kerngegenfärbung

Zur Anfärbung der Kerne wurden die Präparate für 40 Sekunden in Mayer's Hämalaun gestellt.

3.3.9. Eindecken

Nach neuerlichem zehnminütigen Waschen unter laufendem Leitungswasser wurden die Objektträger mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

3.4. Antiseren

3.4.1. Normales Ziegen Serum (NZS)

1 ml lyophilisiertes Globulin von der Ziege wurde jeweils mit 19 ml PBS aufgeschwemmt, sodaß sich eine Verdünnung von 1:20 ergab (Nordic, Niederlande, Katalog Nr. 73410, Code No 37-182).

3.4.2. Anti-Carcinoembryonales Antigen (aCEA)

Als Ausgangsmaterial stand Kaninchenimmungsglobulin gegen Human-CEA zur Verfügung (Dakopatts, Dänemark, Code A 115, Lot. 061 A, Exp. 0687). Dieses Serum erhielt die Bezeichnung aCEA-Dako.

Vom Hersteller wurde aCEA-Dako nur gegen Humanplasma und die Blutgruppenantigene A₂ und B absorbiert (Dakopatts 1981).

Nach Angaben der Herstellerfirma und nach eigenen Versuchen bestand starke Kreuzreaktion mit NCA.

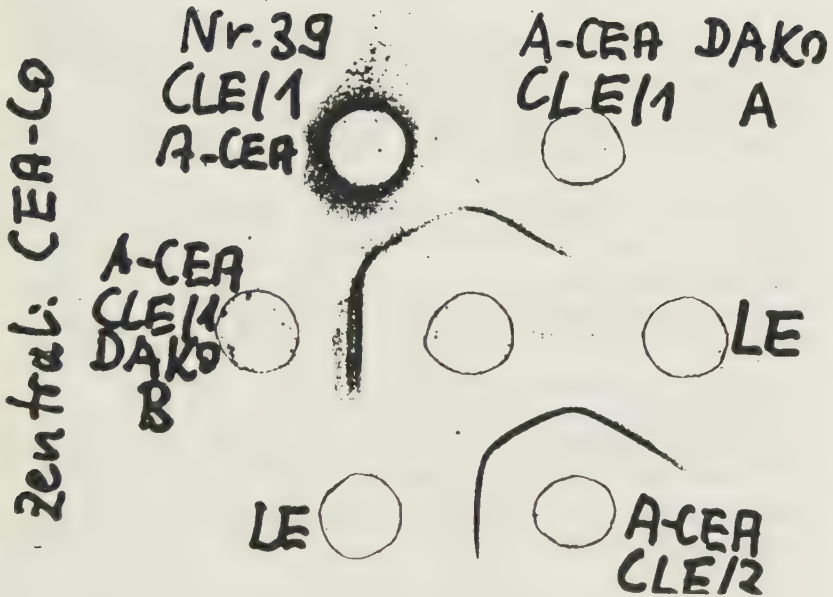


Abb.3: Absorption von aCEA-Dako. Ouchterlonytest.
Zentral ist gereinigtes CEA aufgebracht. Absorbiertes aCEA (A-CEA Dako CLE/1) reagiert noch mit CEA, nicht mehr aber mit Lungenextrakt.
(LE = Lungenextrakt; A-CEA Dako CLE/1 = aCEA-abs; A und B sind zwei verschiedene Chargen; A-CEA CLE/3 = aCEA-Dako (unabsorbiert); Nr. 39 CLE/1 A-CEA = hier nicht verwendetes a-CEA).
(Diese Abbildung wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Lamerz, II. Med. Klinik Großhadern, zur Verfügung gestellt, der auch den Ouchterlonytest durchführte.)

3.4.2.1. Absorption von aCEA-Dako

Um mit NCA kreuzreagierende aCEA-Antikörper zu entfernen, wurde das Antiserum mit einer Sepharose-Säule gereinigt (Prof.Dr.R. Lamerz, Immunologisches Forschungslabor, II.Med.Klinik, LMU Großhadern, Direktor: Prof. Dr. Paumgartner):

In der Säule wurde ein Perchlorsäureextrakt aus normaler Lunge (= NCA-haltiges Material) an CNBr-aktiviertes Sepharose gekoppelt.

Nach Absorption reagierte im Ouchterlonytest (Abb.3) das erhaltene Antiserum nicht mehr mit Lungenextrakt (NCA), sondern nur noch mit gereinigtem CEA, es enthielt somit keine mit NCA kreuzreagierende Antikörper mehr und war monospezifisch für CEA. Es wurde mit aCEA-abs bezeichnet. Wenn nun im Folgenden von CEA-Antiserum gesprochen wird, ist immer aCEA-abs gemeint, es sei denn, es wird ausdrücklich anders angegeben.

3.4.2.2. Optimale Verdünnung von aCEA-abs und aCEA-Dako

Für aCEA-abs wurden normale Dickdarmschleimhaut und zwei Kolonkarzinome (stark und schwach CEA-positiv) mit verschiedenen Titerstufen beschichtet.

Die Verdünnung wurde als optimal angesehen, wenn die normale Mukosa eine deutliche Anfärbung des Epithels ergab, die beiden Tumoren sich deutlich in ihrem Intensitätsgrad der Reaktion unterschieden und keine unspezifische Hintergrundreaktion auftrat (optimale Titerstufe 1:300 in PBS). Für aCEA-Dako betrug nach den gleichen Kriterien die Verdünnung 1:300 (in PBS).

3.4.3. Anti-Nonspecific Crossreacting Antigen (aNCA)

Das Antiserum wurde von Herrn Prof. Lamerz zur Verfügung

gestellt: Mit angereichertem NCA (MG etwa 60.000) wurden Kaninchen immunisiert.

Das so gewonnene Antiserum wurde mehrfach absorbiert: Einmal an einer CEA-Säule (CEA aus Kolonkarzinomen, gereinigt nach dem Prinzip der "high performance liquid chromatography"). Mit CEA kreuzreagierende aNCA-Antikörper wurden so entfernt.

Zum zweiten erfolgte eine Absorption an Lungenextrakten. Dabei wurde die sogenannte "3. Fraktion", also die am Lungen-NCA anhaftenden Antikörper, weiterverwendet. Weitere Absorptionen erfolgten mit AB-Erythrozyten und normalem Serum.

An Protein A-Sepharose, welches die F_C -Teile von Antikörpern bindet, wurde aus dem Antiserum dann reines IgG isoliert, so daß schließlich nur noch spezifisches aNCA-IgG übrig blieb.

Das aNCA-Antiserum wurde an Lunge, Milz, Leber, normalem Kolon und einem Karzinom des Dickdarms ausgetestet. Die Reaktion wurde als optimal betrachtet, wenn die Granulozyten und Makrophagen deutlich positiv reagierten und gleichzeitig der Hintergrund sich nicht rötlich verfärbte (beste Verdünnung 1:600 in PBS).

3.4.4. Anti-Biliary Glykoprotein (aBGP)

Das Antiserum wurde ebenfalls von Herrn Prof. Lamerz freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

BGP wurde aus menschlicher Galle angereichert. Das Verfahren wurde nach Svenberg durchgeführt (Svenberg 1976). Mit BGP wurden Kaninchen immunisiert. Absorbiert wurde das dann gewonnene Antiserum an einer CEA- und einer NCA-Säule.

Für aBGP wurden normale Leber, Lunge und Milz getestet. Wenn die Gallenkapillaren positiv waren, bei negativer Reaktion in Lunge und Milz, wurde die Reaktion als gut beurteilt (optimale Verdünnung 1:300 in PBS).

3.4.5. Anti-Tissue Polypeptide Antigen (aTPA)

Das aTPA-Antiserum wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. B. Björklund, Section of Cancer, National Bacterial Laboratory, Stockholm, Schweden.

Die aTPA-Antikörper stammten von mit TPA:B₁ immunisierten Kaninchen. Das Antiserum war durch Affinitätschromatographie und Absorption mit menschlichem Plasma, Blutzellen, normaler Leber und Milz gereinigt (Chargen-Nr. LE 19/82, 830208).

Mit Hilfe von Hämagglutinationstest, Radioimmunoassay, Immunelektrophorese und Immunodiffusion konnte die Spezifität des aTPA-IgG gezeigt werden (Björklund et al. 1982, Björklund 1983).

Die Reaktion des aTPA-Antiserums wurde als optimal beurteilt, wenn Epithelzellen des normalen Dickdarms positiv waren, ohne daß andere nichtepitheliale Strukturen mitreagierten bzw. eine unspezifische Hintergrundreaktion auftrat. Dies war bei unverdünnter Anwendung der Fall.

3.4.6. Peroxidase gekoppeltes anti-Kaninchen Immunglobulin (PO)

Bei diesem Antikörper handelte es sich um Immunglobulin der Klasse G anti-Kaninchen von der Ziege. Das IgG war mittels Glutaraldehyd mit Meerrettichperoxidase gekoppelt (Miles-Yeda Ltd., Israel Code No. 61-202, Lot No. S 103). In eigenen Vorversuchen wurde eine Verdünnung von 1:400 in PBS festgelegt. Unspezifische Reaktionen traten dabei in den negativen Kontrollen nicht mehr auf.

3.5. Kontrollen

Um Unterschiede bei den Färbungen auszuschließen, die sich dadurch ergeben konnten, daß Präparate eines Markers an

verschiedenen Tagen gefärbt wurden, waren positive Kontrollen notwendig.

In Vorversuchen wurde für jedes Tumorantigen ein stark anfärbbares Präparat ermittelt. Ein Schnitt davon wurde dann jeweils bei dem entsprechenden Experiment und Tag mitbearbeitet. Dieser Kontrolltumor wurde immer zuerst mit den korrespondierenden Vorgängerkontrollen verglichen, bevor die übrigen Schnitte ausgewertet wurden. Wuch der Kontrolltumor in der Färbeintensität ab, so wurde der gesamte Durchgang wiederholt.

Um unspezifische Reaktionen auszuschließen, die nicht dem ersten Antikörper zuzuschreiben waren, wurden negative Kontrollen (Leatham et al. 1981) angefertigt:

Für jedes Präparat wurde ein Schnitt mitgeführt, der, mit der Ausnahme, daß der erste Antikörper wegfiel, genau wie die übrigen Schnitte behandelt wurde.

3.6. Serumspiegel von CEA

Alle Serumbestimmungen von CEA wurden von Prof. Lamerz als Doppelantikörpertest durchgeführt (Lamerz und Ruider 1976). Der Radioimmunoassay (RIA) ermöglicht die direkte Messung. Die verwendeten CEA-Antikörper wurden nach denselben Bedingungen absorbiert, wie aCEA-abs. Es konnten daher im Serum die gleichen Strukturen erkannt werden, wie in der Immunhistochemie.

Die Normgrenze, ermittelt bei gesunden Probanden, war festgelegt auf 3 ng/ml.

3.7. Tumorklassifikation

Von jedem Präparat wurde ein Schnitt mit Hämalaun/Eosin (HE) gefärbt. An den HE-Präparaten wurden die Klassifikationen durchgeführt.

Jeder Tumor wurde bewertet nach

- histologischem Typ (Morson und Sobin 1976, Gibbs 1978)
- TNM-Klassifikation (UICC, 1979)
- Dukes-Klassifikation (Dukes 1932)
- Differenzierungsgrad (Morson und Sobin 1976)
- Schleimbildung

Einen Überblick über die Aufteilung des Untersuchungsmaterials auf die einzelnen Gruppen gibt Tabelle 1.

3.8. Auswertungskriterien Immunhistochemie

Reaktionsintensität:

Die Intensität wurde semiquantitativ nach folgendem Schema beurteilt:

- | | |
|-----------------------------|-----|
| - negativ | Ø |
| - eben sichtbar = schwach | + |
| - gut sichtbar = mäßig | ++ |
| - sehr gut sichtbar = stark | +++ |

Reaktionstyp:

Für jeden Marker wurden Typen klassifiziert, die sich am zellulären Verteilungsmuster orientierten.

Für Reaktionsintensität und Typ wurden für die unten angegebenen Orte (Abb.4) jeweils prozentuale Häufigkeiten bestimmt.

Jene Klasse, die in über 50 % der Zellen anzutreffen war, wurde dann als repräsentativ für den jeweiligen Tumorschnitt angesehen.

Nach dem gleichen Kriterium wurde für den gesamten Tumor ein globales Tumormuster und eine globale Tumorintensität bestimmt.

Für den Vergleich mit durchflußzytometrischen Messungen wurde zusätzlich der Prozentsatz positiver Karzinomzellen sowie die Intensität des membranständigen CEA bestimmt.

Für gesunde Schleimhaut und direkt an den Tumor angrenzende gesunde Schleimhaut (adjacent mucosa) wurden jeweils getrennt der Prozentsatz positiver Zellen, Reaktionsintensität und Typ ausgewertet.

Für an die gesunde Schleimhaut angrenzenden peripheren Tumor, Tumorzentrum und Invasionsfront wurde zusätzlich jeweils getrennt der Prozentsatz nekrotischen Gewebes, dessen Reaktionsintensität und Typ sowie der Prozentsatz intakter Tumorzellen bestimmt.

3.9. Flächen - und Umfangsmessungen

Zur objektiven Messung von Umfang und Flächenanteilen interessierender Gewebebezirke diente das Bildanalysegerät "Videoplan", D 52 SER mit Meßprogramm ohne Histogramm, der Firma Kontron (München).

Bei allen Karzinomen, bei denen ein CEA-Serumspiegel bekannt war, wurden jeweils von der Tumorperipherie, vom Tumorzentrum und von der Invasionsfront die Anteile von nekrotischem und vitalem Tumorgewebe bestimmt. Hierbei wurden pro Tumoreal und Präparat drei Stichproben gemessen und dann der Mittelwert gebildet.

3.10. Statistische Auswertung

Qualitative Merkmale wurden mit Hilfe der Vier/Mehrfeldertafel und des χ^2 -Tests geprüft. Der Unterschied zwischen verschiedenen Mukosaabschnitten des gleichen oder anderer Tumormarker wurde mit dem Vorzeichentest für gepaarte Stichproben überprüft, die Korrelation dabei mit der Vier/Mehrfelderkorrelation (Sachs 1982).

Darmlumen

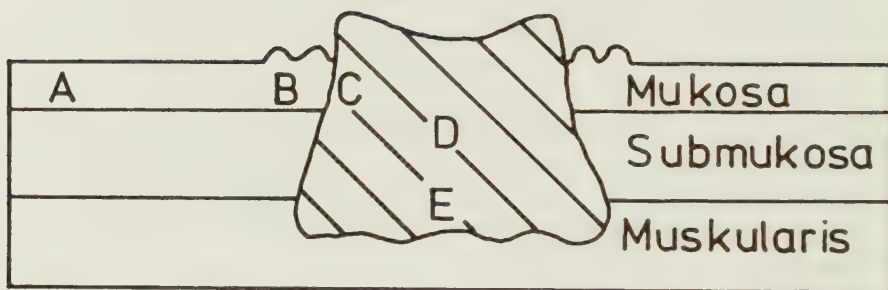


Abb.4: Ausgewertete Stellen pro Präparat. Schematischer Querschnitt durch einen Dickdarmtumor (Schraffur): A = gesunde Mukosa am Resektionsrand, B = "adjacent mucosa", C = an die gesunde Schleimhaut unmittelbar angrenzender peripherer Tumor, D = Tumorzentrum, E = Invasionsfront.

Bei den quantitativen Merkmalen kam als verteilungsfreie Methode der Mediantest zur Anwendung.

Die Übereinstimmung mit den zytophotometrischen Messungen wurde mit der Spearman - Rangkorrelation sowie mit dem Kendall - Test überprüft (Campbell 1971).

Bei der Abklärung von Unterschieden bei planimetrischen Messungen wurde ein U-Test durchgeführt, da dieser keine Gauss-Verteilung voraussetzt.

Tabelle 1: Pathologisch-anatomische Charakteristika von
65 Adenokarzinomen des Dick- und Enddarmes.

Bei 65 kolorektalen Adenokarzinomen wurde bewertet

	(n)
Schleimbildung	
vorhanden	14
nicht vorhanden	51
Differenzierungsgrad	
G 1 = hoch differenziert	10
G 2 = mäßig differenziert	38
G 3 = gering differenziert	17
Tumorstadium nach Dukes	
Dukes A = Tumor auf die Darmwand beschränkt	17
Dukes B = Tumor überschreitet die Darmwand	27
Dukes C = jegliche Tumordinfiltrationstiefe mit Lymphknotenmetastasen	21
Lokalisation im Intestinum	
Coecum	4
Colon ascendens und rechte Flexur	14
Colon transversum und linke Flexur	10
Colon descendens	3
Colon sigmoideum	10
Rectum	24

4. ERGEBNISSE

4.1. Spezifität der Antiseren

4.1.1. aCEA und kreuzreagierende Antikörper

Verschiedene Gewebe oder Zellen können zur Spezifitätsprüfung einzelner Tumorantigene dienen, da diese Antigene in der Literatur als dort exklusiv vorkommend beschrieben sind (Nap et al. 1983).

Um die Frage der Kreuzreaktion von Antiseren gegen CEA, NCA und BGP zu klären, wurden folgende Strukturen ausgewählt:

- NCA : Granulozyten und Makrophagen (Burtin et al. 1975)
- BGP : Gallenkapillaren (Svenberg 1976)
- NCA-2: Magenschleimhaut (Burtin et al. 1973 a, Nap et. al. 1983)
- CEA : Da es kein normales Gewebe gibt, in dem nur CEA, nicht aber NCA vorkommt, wurde ein Kolonkarzinom verwendet, bei dem sich nur mit aCEA, nicht aber mit aNCA eine Reaktion erzielen ließ.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

Anti-CEA-Dako reagierte stark mit Leukozyten in Leber, Lunge, Milz und Lymphknoten (Abb.5), enthielt also noch mit NCA kreuzreagierende Antikörper. Wurde dagegen aCEA-abs verwendet, blieben diese Zellen ungefärbt, d.h. die kreuzreagierenden Antikörper waren eliminiert, das Antiserum war monospezifisch für CEA (Abb.6).

Mit aNCA wiederum ließen sich die Leukozyten gut darstellen, der CEA-Markertumor blieb negativ, d.h. aNCA kreuzreagierte nicht mit CEA und stellte nur NCA-Epitope dar (Abb.7).

Beide, aCEA-abs und aNCA, reagierten nicht mit Gallenkapillaren.

Dies bedeutet, daß eine Kreuzreaktion mit BGP nicht zu erwarten war (also über diesen Umweg auch keine Kreuzreaktion zwischen aCEA-abs und aNCA).

Das aBGP-Antiserum stellte zwar spezifische antigene Determinanten dar, zeigte aber noch Kreuzreaktion mit CEA (siehe 4.1.2.).

Mit NCA-2 reagierte keines der eingesetzten Antiseren.

Tabelle 2: Spezifität der Antiseren. An den verschiedenen spezifischen Strukturen wurden die Antiseren getestet. + = Reaktion, 0 = keine Reaktion.

spezifische Struktur	Antiserum			
	aCEA-Dako	aCEA-abs	aNCA	aBGP
Granulozyten (NCA)	+	0	+	0
Magenschleimhaut (NCA-2)	0	0	0	0
Gallenkapillaren (BGP)	0	0	0	+
NCA-negatives Kolonkarzinom (CEA)	+	+	0	+

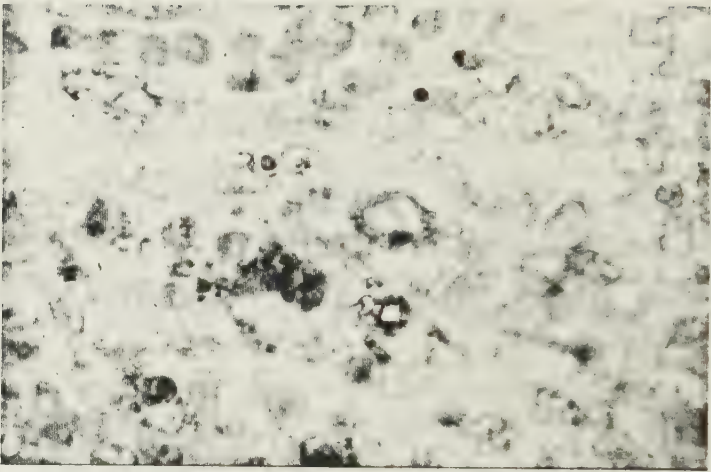


Abb. 5: Histiocyten eines Lymphknoten (keine Beziehung zu einem Malignom). Die Makrophagen reagieren stark mit aCEA-Dako als Beweis der Kreuzreaktion von aCEA-Dako mit NCA. (Vergr. 1:800)

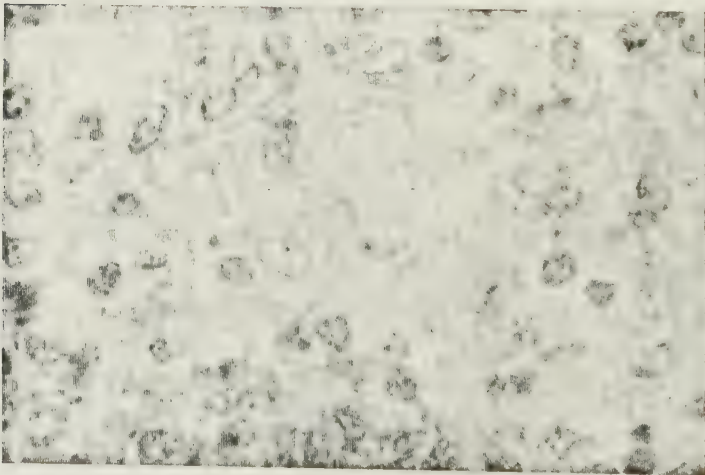


Abb. 6: Gleiche Lokalisation wie bei Abb. 5. Histiocyten reagieren nicht mit aCEA-abs als Beweis der eliminierten Kreuzreaktion von aCEA-abs mit NCA (nach Absorption von kommerziellem Antiserum an Lungengewebe, das NCA enthält). (Vergr. 1:800)

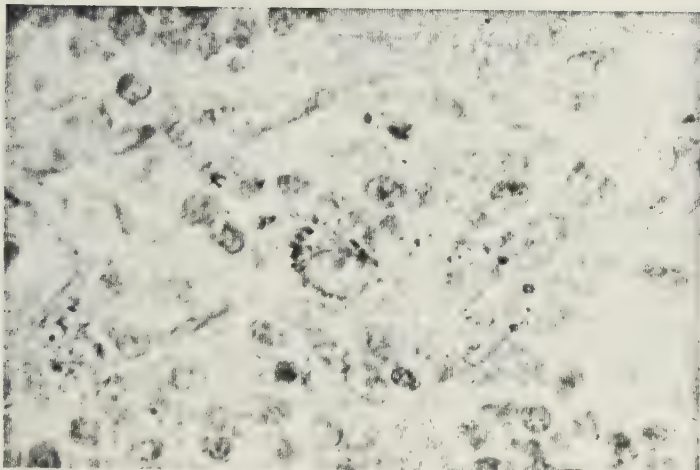


Abb. 7: Gleiche Lokalisation wie bei Abb. 5. Deutliche Reaktion der Histiozyten mit aNCA. Es werden analoge Strukturen dargestellt wie mit aCEA-Dako. (Vergr. 1:800)

Um die Frage der falsch positiven Fälle bei CEA-Dako zu beantworten, wurden Karzinome der Mamma untersucht, weil diese Tumoren wesentlich seltener CEA-positiv sind, aber im Einzelfall starke CEA-Antigenträger sein können. An fünf zufällig ausgewählten Mammakarzinomen wurden aCEA-Dako, aCEA-abs und aNCA getestet. Das Ergebnis zeigt die Tabelle 3.

Tabelle 3: Drei Antiseren (aCEA-Dako, aCEA-abs und aNCA)
bei fünf Mammakarzinomen.
O = keine Reaktion, + = Reaktion

Tumor	Antiserum		
	aCEA-Dako	aCEA-abs	aNCA
Nr. I	O	O	O
Nr. II	O	O	O
Nr. III	+	O	+
Nr. IV	+	O	+
Nr. V	+	+	O

Dies läßt den Schluß zu, daß mit den Antiseren aCEA-abs und aNCA offensichtlich unterschiedliche Epitope der Karzinomzellen erkannt werden, daß aber CEA-Dako nicht in der Lage ist, hier zu differenzieren. Nr. III und IV enthielten nur NCA, Nr. V nur CEA, mit unabsorbiertem anti-CEA-Antiserum würden aber alle drei Karzinome - fälschlicherweise - als CEA-positiv bewertet.

4.1.2. aBGP

Mit aBGP wurden folgende Organe untersucht: Lunge, Milz, Magen, Leber und Kolon (alle ohne Tumorgewebe) sowie zwei Kolonkarzinome.

Keine Anfärbung war zu sehen bei Lunge, Milz und Magen.

In normaler Leber zeigte sich folgendes Reaktionsmuster:

Zwischen den Hepatozyten war eine netzförmige Struktur zu erkennen, die den Gallenkapillaren zugeordnet werden konnte (Abb.8). Ferner färbte sich das Lumen der kleineren intrahepatischen Gallengänge an. Die Hepatozyten selbst wiesen keine Positivität auf.

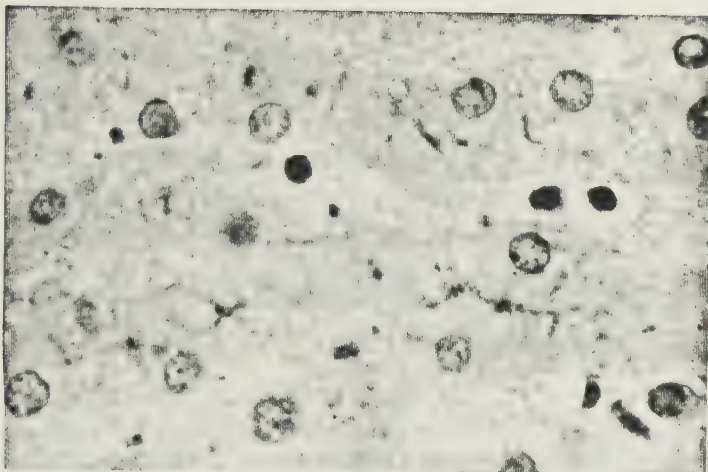


Abb.8: aBGp in der Leber. Es reagieren deutlich die Gallenkapillaren, die Hepatozyten bleiben frei (Vergrößerung 1:800).

Normaler Dickdarm und die beiden Tumoren zeigten ein zu CEA identisches Reaktionsmuster. Dies begründete den Verdacht, daß neben spezifischen aBGp-Antikörpern noch mit CEA kreuzreagierende Antikörper im Antiserum enthalten waren. Später konnten auch im CEA-Radioimmunoassay die kreuzreagierenden Antikörper nachgewiesen werden (Lamerz, persönliche Mitteilung). Das Antiserum war folglich nicht monospezifisch und damit in dieser Form nicht weiter verwertbar.

4.1.3. Kontrollen

Die unter 3.5. beschriebenen negativen Kontrollen zeigten durchwegs keine unspezifischen Anfärbungen, abgesehen von leicht zu erkennenden Farbherden, hervorgerufen durch Formalinreste in der Muscularis propria in wenigen Präparaten.

4.2. CEA

4.2.1. Normale Mukosa

Von den 65 untersuchten Fällen wiesen 60 eine positive Reaktion auf. 5 waren komplett negativ. In der Regel waren unter den positiven Schleimhautpräparaten 10 - 40 % der Epithelzellen angefärbt.

Bei der Reaktionsintensität überwog die mäßige (++) Ausprägung, der 41 % angehörten, 31 % waren stark, 20 % schwach positiv.

33 Fälle zeigten ein luminales, 10 ein zytoplasmatisches und 22 Fälle ein Mischbild aus den beiden ersten Mustern. Beim luminalen Muster (Abb.9) konzentrierte sich CEA an der Zelloberfläche, der zum Darmlumen hin gelegenen freien Zellmembran. Lichtmikroskopisch schien dieser Bezirk der Glykokalix zu entsprechen. Das restliche Zytoplasma blieb bis auf einzelne CEA-reaktive Depots frei. Färbte es sich dagegen diffus an, so handelte es sich um den zytoplasmatischen Typ.

Der Schleim der Becherzellen war immer negativ, Darminhalt gelegentlich leicht positiv. Saum- und Becherzellen zeigten teils ähnliche, teils unterschiedliche Reaktionsintensitäten (die Saumzellen waren dann stärker positiv) im gleichen Präparat. Als Sonderform des zytoplasmatischen Typs wiesen 5 Präparate eine supranukleäre Betonung von CEA auf. In der Mehrzahl der Fälle nahm die Reaktionsintensität zur Tiefe der Krypten zu ab, einige Krypten waren gänzlich negativ. Nur bei 7 Präparaten waren alle Kryptenepithelien positiv.

4.2.2. An den Tumor angrenzende gesunde Schleimhaut ("adjacent mucosa")

Die an den Tumor unmittelbar angrenzende, noch gesunde Schleimhaut zeigte eine deutliche Zunahme der Zahl angefärbter Epithelzellen. Im Schnitt waren 30 - 60 %, in einigen Fällen sogar bis 90 % der Saum- und Becherzellen positiv. Die Zunahme der Reaktion war vor allem darauf zurückzuführen, daß das Epithel bis in die Tiefe der Krypten CEA-reaktiv war (Abb.10).

57 % der Präparate wiesen eine identische, meist mäßige (++) Reaktionsintensität im Vergleich zur normalen Schleimhaut auf. 27 % waren stärker und 16 % schwächer angefärbt, statistisch war aber die Tendenz zur stärkeren Reaktion nicht signifikant.

Beim Reaktionstyp herrschte eine Verschiebung vom luminalen zum zytoplasmatischen Typ vor. Trotzdem waren weiterhin der luminale und der Mischtyp leicht Überwiegend. Wieder war in einigen Fällen eine supranukleäre Anfärbung zu beobachten.

4.2.3. Karzinome

4.2.3.1. Allgemeine Beobachtungen

Immunhistochemisch erwiesen sich die untersuchten Karzinome als überwiegend homogen. Nur 21 Fälle zeigten drei oder alle Intensitätsstufen (0 bis +++) gleichzeitig, 19 Fälle wiesen verschiedene Färbetypen in größeren Arealen eines Tumors auf.

Nach den oben (3.8.) angegebenen Kriterien konnten aber alle Karzinome eindeutig klassifiziert werden.

In der Mehrzahl der Fälle war CEA auch im überwiegenden Anteil der Tumorzellen nachzuweisen (Tab.4.). Gleichwohl gab es komplett CEA-negative Karzinome.

Im Vergleich zur normalen Mukosa war die Reaktionsintensität signifikant stärker im Karzinom ($p < 0,05$).

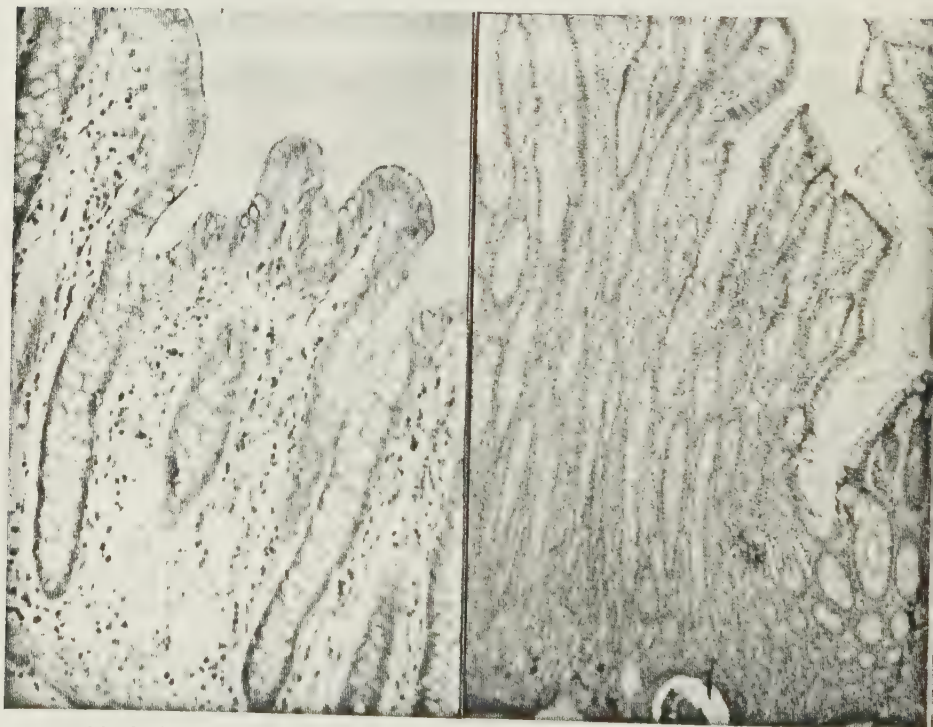


Abb.9 (links): CEA, normale Mukosa. CEA ist hauptsächlich am luminalen Zellpol der Epithelien kondensiert. Im Zytoplasma einzelne Antigen-Depots. In der Tiefe der Krypten kein CEA. (Vergr. 1:175)

Abb.10(rechts): CEA, adjacent mucosa. CEA liegt auch in der Tiefe der Krypten vor. (Vergr.1:80)

Geht man dabei die Stationen "normale Mukosa", "adjacent Mukosa" und "peripherer Tumor" nacheinander durch, so war der Unterschied zwischen normaler und adjacent Mukosa eher diskret im oben beschriebenen Sinne, zwischen adjacent Mukosa und Tumor bestand dann ein Intensitätssprung mit höherer Intensität in den Karzinomen.

Beim Färbemuster konnte im Vergleich zu normaler Mukosa bei den Karzinomen eine Abnahme des luminalen Typs, eine Zunahme des zytoplasmatischen Musters sowie das Auftreten eines neuen Reaktionstyps beobachtet werden (siehe 4.2.3.3.).

Der Schleim von muzinösen Karzinomen war durchwegs nicht reaktiv, weder intra- noch extrazellulär. Histiozyten und Granulozyten waren negativ. Eine Ausnahme bildeten einzelne Leukozyten, bei denen reaktives Material unmittelbar intrazellulär lag. Diese Zellen waren nur in Tumornähe zu beobachten.

4.2.3.2. Reaktionsintensität

Von den 65 Karzinomen wurden 7 Fälle (11 %) als nicht reaktiv beurteilt, 89 % zeigten zumindest eine schwache Reaktion. Von diesen 7 negativen Tumoren war nur eine zugehörige normale Mukosa ebenfalls negativ, bei 2 Malignomen reagierte sie schwach, bei einem mäßig und bei drei weiteren stark positiv. G 1-Tumoren erwiesen sich zu 80 % als stark positiv, kein Karzinom war negativ (Abb. 11). G 2- und G 3-Tumoren zeigten in 47 % bzw. 41 % eine starke Positivität, 11 % bzw. 18 % waren ohne Reaktion (Abb. 16). Trotzdem war auch bei den entdifferenzierten Tumoren die Mehrzahl (79 % bzw. 70 %) mindestens mässig reaktiv (Abb. 11).

Die Tumorinvasivität (nach Dukes) hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Reaktionsintensität. In allen Stadien waren 70 bis 80 % der Karzinome mäßig und/oder stark positiv.

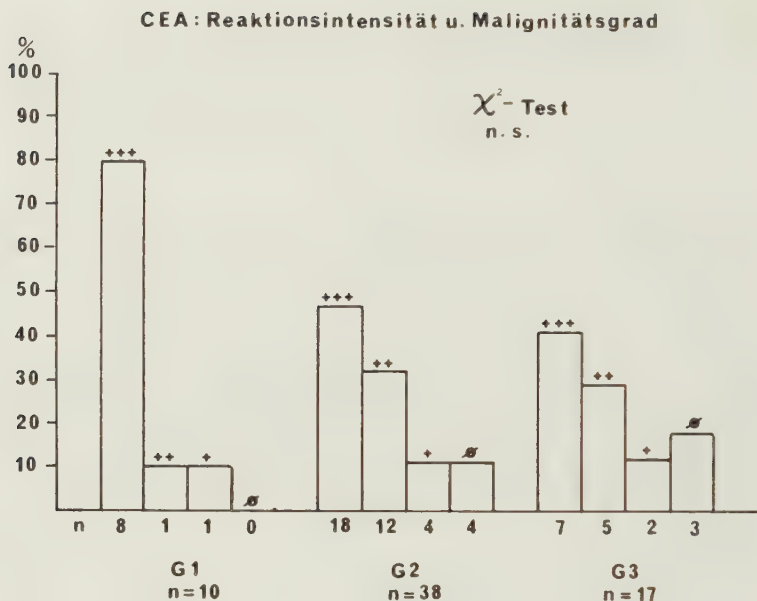


Abb.11: CEA: Verteilung der Reaktionsintensität bei verschiedenen Tumordifferenzierungsgraden. G 1 = hoch differenziert, G 2 = mäßig differenziert, G 3 = gering differenziert. 0 = negativ, + = schwach, ++ = mäßig, +++ = stark reaktiv.

Die schleimbildenden Karzinome waren entweder mäßig/stark positiv (71 %) oder negativ (29 %). Die nicht-muzinösen Tumoren zeigten dagegen eine gleichmäßigere Verteilung der Intensitätsgrade und nur 6 % negative Fälle. Dieser Unterschied war signifikant ($p < 0,05$).

Die Lokalisation der Karzinome in den verschiedenen Darmabschnitten hatte keinen Einfluß auf die Reaktionsintensitäten. Je ein negativer Tumor war im Coecum, Colon ascendens und transversum, je zwei in Sigma und Rektum lokalisiert.

4.2.3.3. Reaktionstypen

Auch in den Karzinomen war ein luminales (Abb. 13) und ein zytoplasmatisches Muster (Abb. 14) zu beobachten, auch ein Mischbild existierte. Zusätzlich war ein Reaktionstyp zu beobachten, bei dem, ähnlich dem Luminaltyp, CEA-positives Material an der Zellmembran lag, aber nicht auf dieser, sondern unter ihr, in Richtung zum Zentrum hin. Dieser Typ wurde als Apikaltyp bezeichnet (Abb.15).

Beim Zytoplasmatyp zeigte sich bei hoher optischer Auflösung, daß das CEA nicht völlig regelmäßig in der Zelle verteilt lag, sondern eine granuläre, z.T. auch ringförmige Feinstruktur aufwies (Abb.14).

Beim luminalen Typ waren regelmäßig außer den flachen Zellmembranauflagerungen stark angefärbte fingerförmige Ausziehungen zu sehen. In vielen Präparaten löste sich in einigen Tumorbezirken diese kombinierte Auflagerung in toto vom apikalen Tumorzellpol ab. Ein auffälliges, in mehreren Präparaten anzutreffendes Phänomen war das gleichzeitige Vorkommen von komplett negativen und positiven Zellen unmittelbar nebeneinander in der selben Drüsenformation (Abb.14).

G 1-Tumoren zeigten am häufigsten den Luminal- und den Mischtyp (30 % bzw. 50 %). Der apikale und der Zytoplasmatyp waren nur mit je 10 % vertreten.

Bei den G 2-Tumoren gehörten 24 % dem zytoplasmatischen Muster an, 16 % dem apikalen, 13 % dem Mischtyp und 37 % dem luminalen Muster.

Die G 3-Tumoren wiesen dagegen in 41 % das zytoplasmatische Muster in jeweils 24 % Misch- und Luminaltyp auf, der Apikaltyp war nicht vertreten.

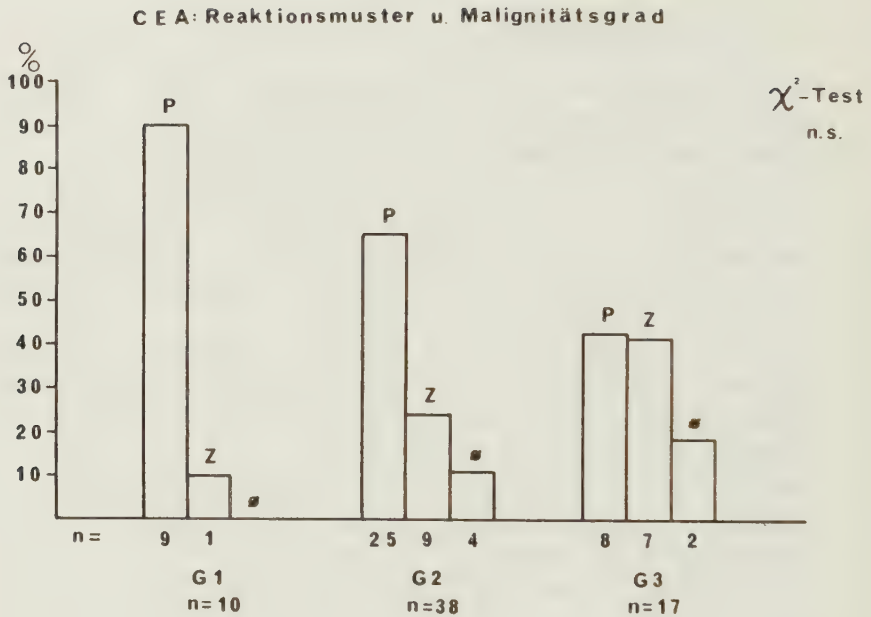


Abb. 12: CEA: Verteilung der Reaktionsmuster bei verschiedenen Tumordifferenzierungsgraden.
G 1= hoch differenziert, G 2= mäßig differenziert, G 3 = gering differenziert.
P = Tumoren mit polarer Komponente, Z = Tumor mit rein zytoplasmatischem Muster, Ø = Tumor ohne Reaktion.

Diese Tendenz wird deutlicher, wenn man alle Typen mit einer polaren Komponente zusammenfaßt (Luminal-, Misch- und Apikaltyp) und sie den rein zytoplasmatischen Fällen gegenüberstellt: Es ergibt sich eine Zunahme des Zytoplasmatyps und eine Abnahme der polaren Muster mit zunehmender Entdifferenzierung (Abb.12).

Eine ähnliche Tendenz zum zytoplasmatischen Typ zeigte sich bei der Klassifikation nach Dukes. Er stieg in der Häufigkeit von Dukes A zu C von 18 % auf 48 %.

Die schleimbildenden Karzinome waren sehr häufig vom luminalen Typ (36 %) und nur selten zytoplasmatisch reagierend (7 %). Die nicht-muzinösen Tumoren waren häufiger vom Zytoplasmatyp (31 %) und etwas seltener luminal reagierend (29 %). Von den 7 apikalen Fällen war nur einer bei einem schleimbildenden Karzinom anzutreffen, dagegen 6 bei nicht-schleimbildenden Tumoren.

Die Tumoren des Kolon zeigten eine Vorliebe für eine polare CEA-Verteilung (79 %), bei Rektumkarzinomen war dieses Muster nur bei 54 % der Fälle vertreten.

Unabhängig von histopathologischen Kriterien zeigten verschiedene Karzinome eine Gemeinsamkeit: In Arealen mit schwacher oder weitgehend fehlender CEA-Expression war bei einzelnen Tumorzellen bei starker Vergrößerung Antigen nachzuweisen. Es fand sich jedoch nur in den einander berührenden Zellmembranen zweier oder mehrerer benachbarter Tumorzellen. Ein ähnliches Muster wiesen Tumorareale mit intrazytoplasmatisch reaktiven Einzelzellen auf. Lagen solche Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft, so wechselte das Muster dieser Zellen oft zum Luminaltyp.

4.2.3.4. Extrazelluläres CEA

Als extrazelluläres CEA wurde solches Antigen betrachtet, das außerhalb vitaler Zellen anzutreffen war. Es wurden zwei Varianten extrazellulären CEA-positiven Materials gefunden: Einmal kleine meist stark positive Partikel, die den Auflagerungen von CEA auf der Zellmembran ähnlich waren (Abb.13). Dieses Material lag z.T. in Drüsenlumina, z.T. frei in Bindegewebe.

Zum anderen sah man größere Areale mit extrazellulärem CEA, das offenbar aus zugrundegegangenen Tumorzellverbänden stammte (Abb.17). Teilweise konnten noch Zell-

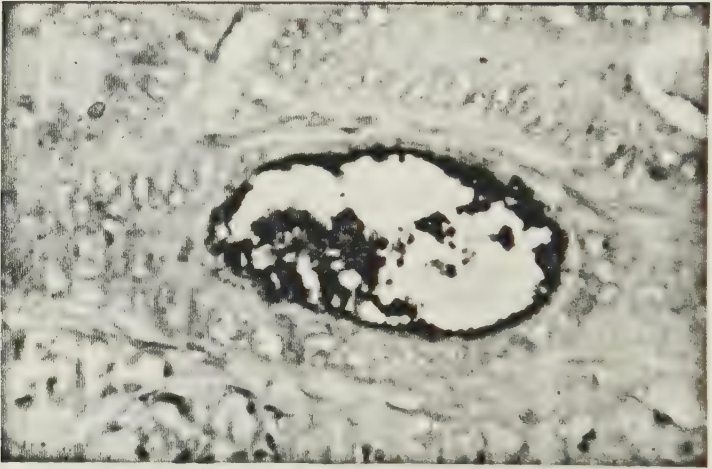


Abb.13: CEA: luminales Reaktionsmuster. CEA liegt bei einem gut differenzierten Karzinom nur am apikalen Zellpol, an der Außenseite der Zelle. Im Drüsenlumen liegen stark reaktive CEA-positive Strukturen. (Vergr.1:500)

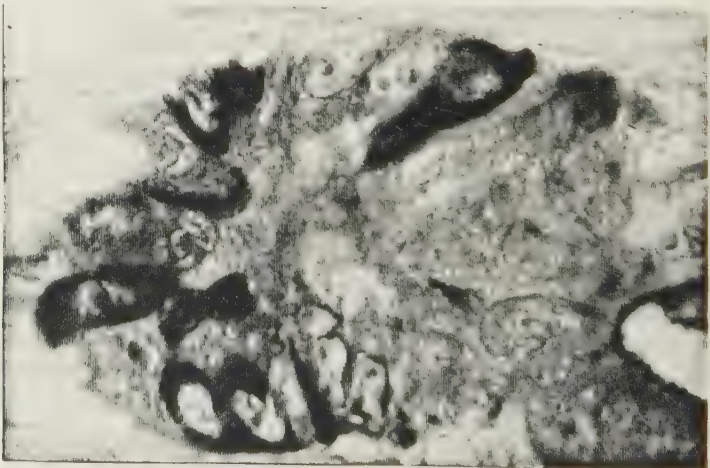


Abb.14: CEA: zytoplasmatisches Reaktionsmuster. (Hier mit Einzelzellunterschieden). Granuläre Feinstruktur von CEA (Vergr. 1:980).

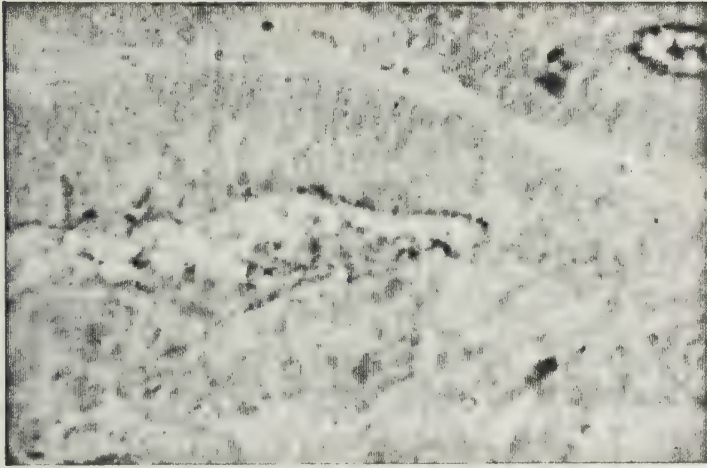


Abb.15: CEA: apikales Reaktionsmuster. CEA liegt bei einem mäßig differenzierten Karzinom zwar am apikalen Zellpol, aber deutlich innerhalb der Zellmembran; die Mikrovilli bleiben weitgehend frei (Vergr.1:550).

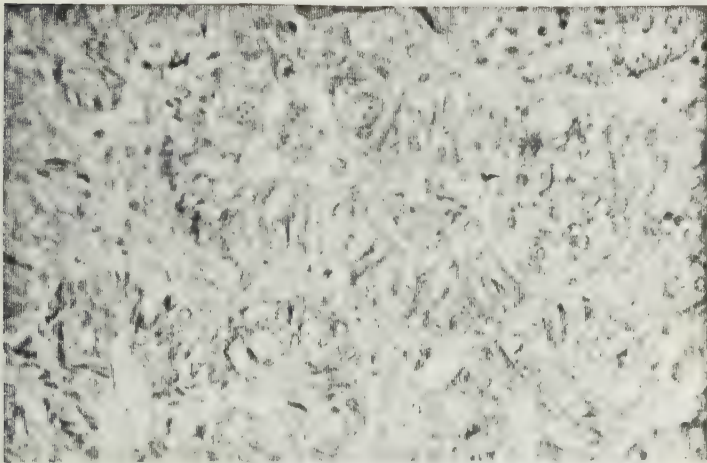


Abb.16: CEA: nicht reaktives Karzinom, bei teils mäßiger, teils geringer Differenzierung (Vergr.1:250).

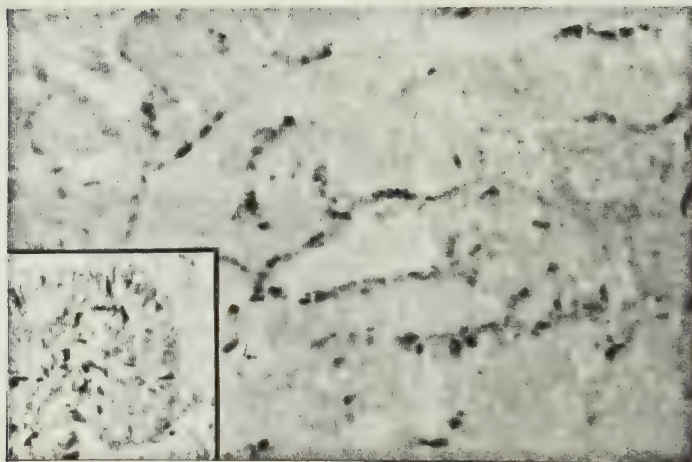


Abb.17: CEA: Die Tumornekrose behält das (in diesem Fall apikale) Reaktionsmuster der vitalen Karzinomzellen bei. Großes Bild: Tumornekrose, zentral noch Drüsenstruktur erkennbar (Vergr.1:400). Kleines Bild: vitales Tumorgewebe (Vergr. 1:225).

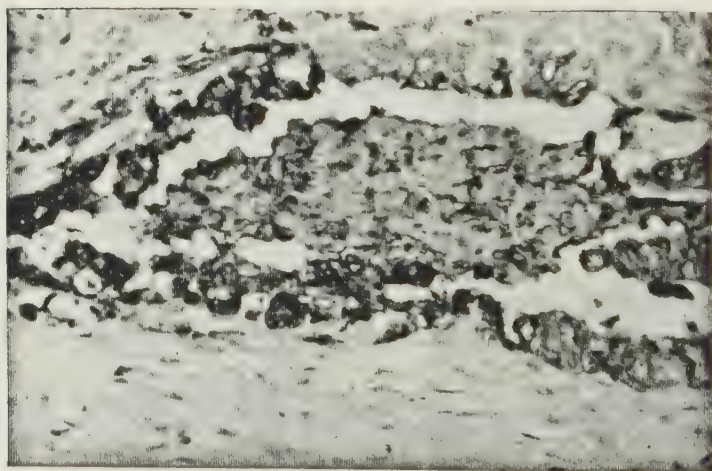


Abb.18: CEA: Nekrotisches Material ist stärker positiv als vitales Tumorgewebe. Rechts im Bild intakte Tumorzellen mit intrazytoplasmatischem Muster. Links zerfallener Tumor mit sehr starker Reaktion (Vergr.1:290).

kernreste ausgemacht werden. CEA-reaktives Material lag hier nicht amorph vor, sondern hatte zumeist exakt das Muster, das vitale Tumorzellen der Umgebung aufwiesen. Die Intensität war in nekrotischen Arealen bei einigen Fällen sogar höher als in der Umgebung (Abb.18).

4.2.4. Immunhistochemie und Serumspiegel

Bei 33 Karzinomen lagen gleichzeitig Histologie und Serumwerte für CEA vor. 20 Fälle zeigten normale Titer, bei 13 Patienten lagen erhöhte Werte vor. Der höchste Wert war 40 ng/ml.

Der Differenzierungsgrad ergab keinen signifikanten Einfluß auf den Serumspiegel.

Die Aufteilung nach Dukes ergab dagegen signifikante Hinweise auf ein vermehrtes Vorkommen hoher Titer beim Stadium Dukes B und C (Abb.19).

Einen signifikanten Unterschied zeigten die verschiedenen Reaktionsintensitäten: Keiner der immunhistochemisch negativen oder schwach positiven Fälle hatte einen erhöhten Serumspiegel. Dagegen wiesen die mäßig positiven in 31 %, die stark positiven Fälle sogar in 64 % erhöhte Serumwerte auf (Abb.20).

Die Korrelation mit dem Reaktionsmuster in der Tumorzelle ergab kein einheitliches Bild. Einerseits war der zytoplasmatische Typ zu 14 % mit erhöhten Serumspiegeln verbunden, der luminale Typ aber zu 33 %. Andererseits wiesen aber Misch- und Apikaltyp hier Raten von 83 % bzw. 75 % auf. Stellt man wiederum alle Formen mit polarer Komponente dem zytoplasmatischen Typ gegenüber (siehe 4.2.3.3.), so ergibt sich eine Tendenz zu erhöhten Titern bei Karzinomen mit polarer Komponente.

Nach planimetrisch-rechnergestützter Auswertung der verschiedenen Gewebeanteile der Invasionsfront der Tumoren ergab sich folgendes Bild: Der Anteil von Tumorzellen am Gesamtareal unterschied sich bei Karzinomen mit normalem

bzw. erhöhtem Serumwert nicht signifikant. Das Gleiche gilt für die jeweiligen Prozentsätze von Bindegewebe und intraglandulärem CEA-reaktivem Material. Ein signifikanter Unterschied war allerdings beim Anteil von "zellfreien- nekrotischen Arealen" (ZN-Areale) zu verzeichnen. Als ZN-Areale wurden solche Bezirke klassifiziert, die CEA-reaktives Material außerhalb vitaler Tumorzellen, insbesondere außerhalb intakter Drüsenlumina, enthielten. Zum Teil war Zelldebris in den ZN-Arealen enthalten. Bei Betrachtung der Umfänge der ZN-Areale (als Maß für die Oberflächen) waren ähnliche Verhältnisse anzutreffen wie bei den Prozentanteilen der verschiedenen Gewebe (Tab.4).

Tabelle 4:

Unterschiede von kolorektalen Karzinomen mit normalem und erhöhtem CEA-Serumspiegel bei planimetrischer Messung von Umfang und Flächeninhalt von Strukturanteilen der Tumordinvasionsfront.

Parameter	Unterschied im Gewebsanteil der beiden Gruppen (Karzinome mit normalem und mit erhöhtem Serumspiegel): U-Test			
	Tumor- zellen	ZN-Areale	intragland. Material	Binde- gewebe
Fläche (%-Anteil)	n.s.	p <0,05	n.s.	n.s.
Umfang	n.s.	p <0,01	n.s.	n.s.

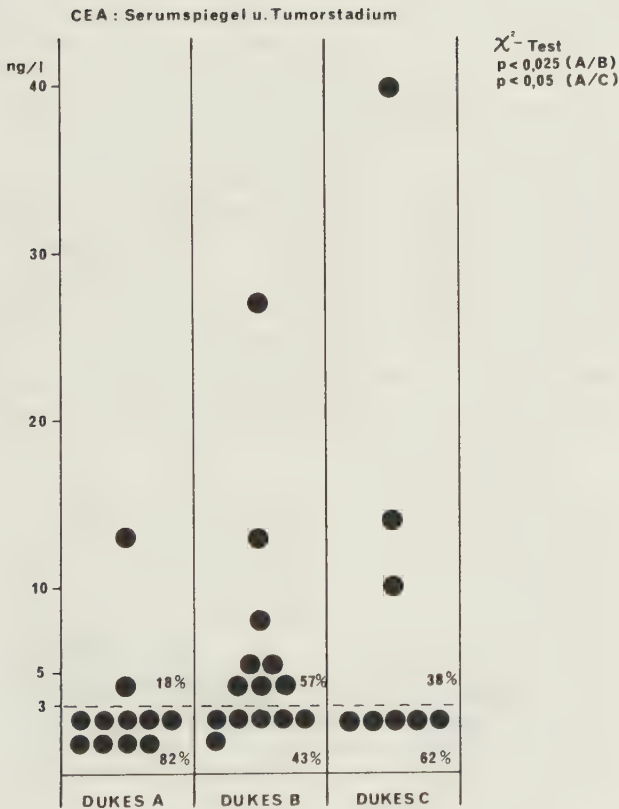


Abb.19: CEA: Korrelation von Tumorinvasion (nach Dukes) und präoperativem Serumspegel (n= 33). Auf der Abszisse ist die Tumorinvasion nach Dukes angegeben, auf der Ordinate der CEA-Serumspegel (Normwert 3 ng/ml).

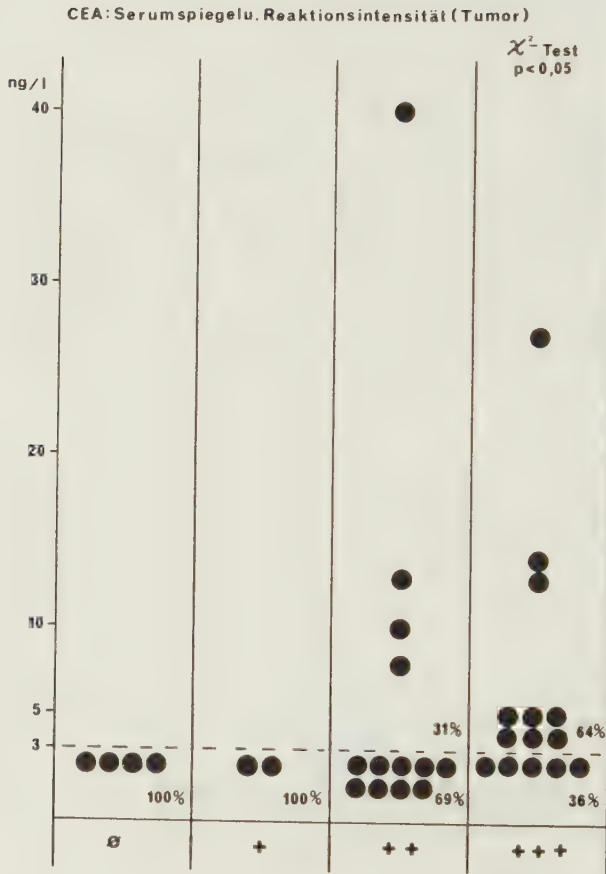


Abb.20: CEA: Korrelation der Reaktionsintensität der Tumoren mit dem präoperativen Serumspegel (n=33). Auf der Abszisse ist die Reaktionsintensität (Ø bis +++) angegeben, auf der Ordinate der CEA-Serumspegel (Normwert 3ng/ml).

4.2.5. Immunhistochemie und Durchflußzytometrie

Die von Wirsching (1984) gemessene CEA-Expression der Tumorzelle konnte direkt mit der Reaktionsintensität im mikroskopischen Präparat verglichen werden, da identisches Antiserum verwendet wurde.

Bei 29 Karzinomen, die sowohl immunhistochemisch als auch zytometrisch untersucht wurden, ergab sich eine gute Übereinstimmung beider Methoden.

Der geschätzte Prozentanteil CEA-reaktiver Tumorzellen im histologischen Präparat korrelierte gut ($p < 0,01$) mit den Messungen der Durchflußzytometrie. Die gleiche Aussage gilt für den Vergleich von Reaktionsintensität und Antigenexpression ($p < 0,05$), wobei hier nur die Reaktivität des membranständigen CEA aus der Immunhistochemie mit den Ergebnissen der Durchflußzytometrie verglichen wurde (Abb.21).

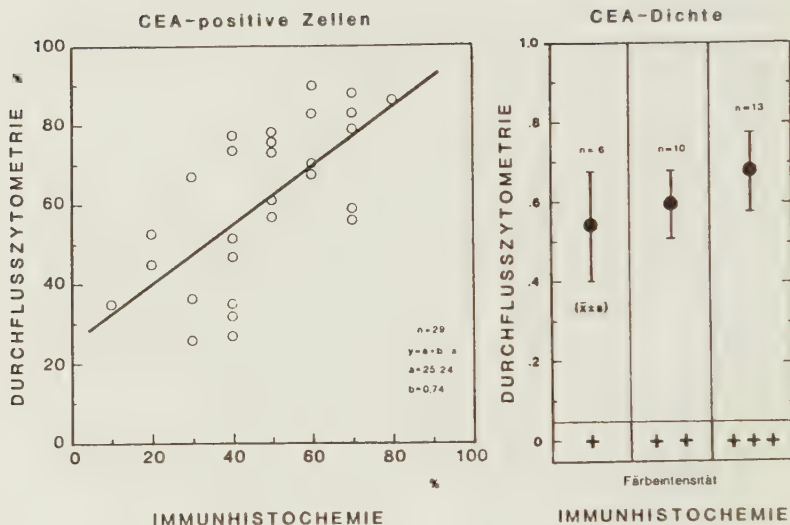


Abb.21: CEA: Korrelation zwischen immunhistochemischer und durchflußzytometrischer Bestimmung der zellulären CEA-Expression ($n = 29$). Auf der Abszisse sind jeweils die Resultate der immunhistochemischen, auf der Ordinate die Ergebnisse der durchflußzytometrischen Messung aufgetragen.
 Links: Vergleich der Prozentsätze CEA-positiver Zellen (Korrelation: $r = 0,668$, $p = 0,001$).
 Rechts: Vergleich der CEA Färbeintensität (+ bis +++) und der CEA-Dichte (Mittelwert der durchflußzytometrischen Meßwerte jeweils einer histochemischen Reaktionsintensität). (Korrelation: $r = 0,320$; $p < 0,05$).
 (Aus: Wirsching R., Habil. Schrift 1984)

4.3. NCA

4.3.1. Normale Mukosa

Etwas mehr als die Hälfte (34 von 65) der Präparate zeigte keinerlei NCA-reaktives Material. Von den 31 positiven Fällen war der überwiegende Teil gering (+) angefärbt und zeigte ein zytoplasmatisches Muster in 5 bis 10 % der Epithelzellen. In sechs Präparaten war NCA infranukleär kondensiert.

Sechs Fälle zeigten ein luminales Muster, zwei Fälle einen Mischtyp aus den beiden erstgenannten Mustern. Alle diese Präparate waren stärker (++)/(+++) angefärbt. Eine positive Reaktion war bei den Präparaten nur in den oberflächlich gelegenen Epithelzellen nachzuweisen, nicht aber in den Krypten. Der Becherzellschleim war negativ. Außer den Darmepithelien zeigten noch Granulozyten und Histozyten eine Farbreaktion.

4.3.2. An den Tumor angrenzende gesunde Schleimhaut (adjacent mucosa)

Der überwiegende Teil der Schleimhautschnitte zeigte gleiches Muster und gleiche Reaktionsintensität wie die normale Mukosa (53 von 65). Wieder überwogen die negativen Fälle. Je sechs Präparate waren stärker bzw. schwächer angefärbt.

Die Zahl der positiven Zellen war in der "adjacent mucosa" geringfügig höher als am Resektionsrand.

4.3.3. Karzinome

Von den drei untersuchten Tumorantigenen war NCA in den kolorektalen Karzinomen am wenigsten exprimiert. Dies bezog sich sowohl auf die Anzahl der positiven Fälle als auch auf die Reaktionsintensität.

4.3.3.1. Reaktionstypen

Die bei CEA beobachteten Reaktionstypen waren mit Ausnahmen auch bei NCA vertreten. Allerdings überwog bei NCA das zytoplasmatische Muster (Tab. 5).

Der zytoplasmatische Typ zeigte dabei Besonderheiten. Das antigene Material lag nicht diffus in der Zelle, sondern ordnete sich zu kleinen Depots an. Bei starker Vergrößerung erkannte man zahlreiche nebeneinander liegende Vakuolen, die von NCA ausgefüllt wurden (Abb.22). Durch ein Fehlen von NCA im Zentrum der Vakuole ergab sich häufig eine Ringstruktur.

G 1-Karzinome waren zum überwiegenden Teil vom zytoplasmatischen Typ. Dieser stellte, nach den negativen Fällen, auch die größte Gruppe der mäßig differenzierten Karzinome, aber es fiel hier eine größere Anzahl von luminalen und Mischmustern auf. Die entdifferenzierten Tumoren zeigten eine Bevorzugung der zytoplasmatischen Form und des Mischtyps. Die Abb. 23 zeigt die Verhältnisse bei Gegenüberstellung des Zytoplasmatyps und allen Typen mit polarer Komponente (luminaler und Mischtyp).

Das Tumorstadium zeigte folgende Einflüsse auf das Reaktionsmuster: Die nicht reaktiven Karzinome waren mit 47 % relativ am häufigsten im Stadium Dukes A vertreten. In den höheren Stadien betrug ihr Anteil 26 % bzw. 28 %. Nur ein Drittel der Fälle von Dukes A hatte ein zytoplasmatisches Muster, Dukes B und C dagegen knapp in der Hälfte der Fälle. Der Mischtyp bzw. der luminale Typ waren im Stadium Dukes B und C etwas stärker vertreten als bei Dukes A. Die Tumoren des Kolon zeigten eine deutliche Präferenz des zytoplasmatischen Typs (49 %). Diese Muster war auch bei den Rektalkarzinomen vorherrschend (38 %), jedoch waren der luminale und der Mischtyp mit 17 % und 21 % mehr als doppelt so stark vertreten wie bei den Kolontumoren (5 bzw. 10 %).

Schleimbildung und Reaktionstyp wiesen keine Korrelation auf.

Nekrotisches Material in der Umgebung von Karzinomzellen ließ oft noch das Muster der benachbarten Tumorzellen, sei es luminal, sei es granulär-zytoplasmatisch, erkennen.

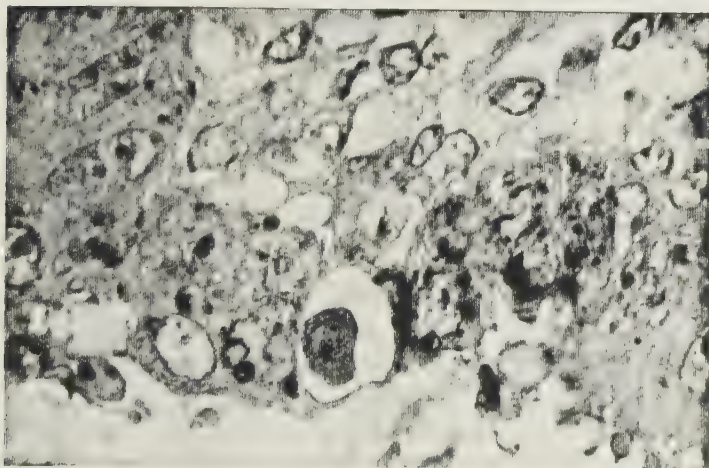


Abb.22: NCA: Intrazytoplasmatische Lage des Antigens bei entdifferenziertem Karzinom. Deutlich sind Ringstrukturen von NCA erkennbar. (Vergr. 1:800).

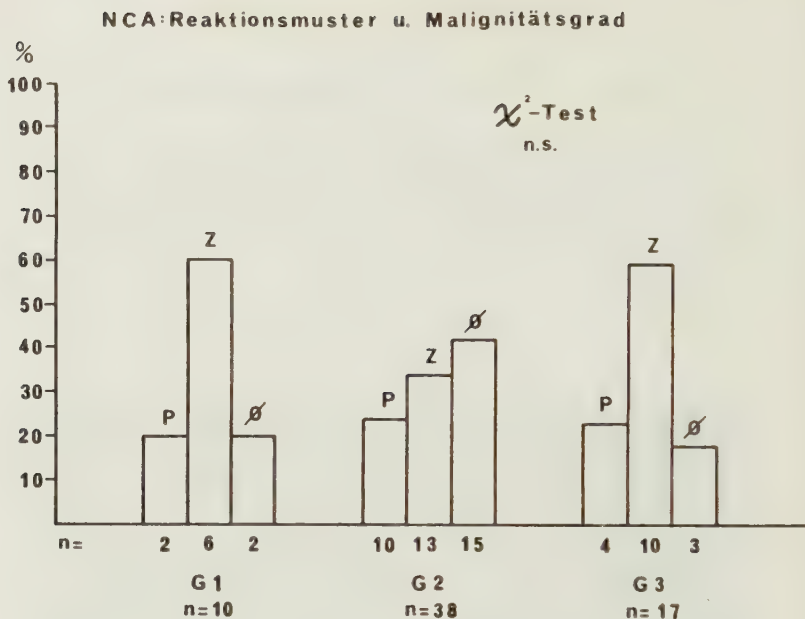


Abb.23: NCA: Korrelation des Tumordifferenzierungsgrades mit dem Reaktionsmuster.
G 1 = gut -, G 2 = mäßig -, G 3 = gering differenziert; P = Tumor mit polarer Komponente, Z = Tumor mit zytoplasmatischem Muster, Ø = negativer Tumor.

4.3.3.2. Reaktionsintensität

Die NCA-positiven Strukturen ließen sich in drei Gruppen einordnen:

1. Granulozyten und Histozyten unabhängig vom Tumor
2. Tumorzellen
3. in unmittelbarer Umgebung des Tumors gelegene Zellen, die möglicherweise Makrophagen waren.

Granulozyten/Histozyten, die tumorfern lagen, reagierten aufgrund der Markereigenschaft von NCA meist schwach bis mäßig. Die Tumorzellen boten das gesamte Spektrum

der Intensitätsskala. Die am Tumor direkt liegenden Zellen, vermutlich Histiozyten, reagierten aber immer stark positiv (+++), im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Makrophagen.

Von den 65 immunhistochemisch untersuchten Fällen reagierten 21 negativ, 15 Präparate waren schwach, 18 mäßig und 11 stark positiv.

Korreliert man die Reaktionsintensität mit dem Differenzierungsgrad, so ergibt sich die Tendenz, daß bei den gut und mäßig differenzierten Tumoren die Anfärbbarkeit eher zu niedrigen, bei den entdifferenzierten eher zu den höheren Intensitäten tendiert. Auffallend war die Häufung der negativen Fälle bei G-2 Tumoren. Trotz der beschriebenen Tendenz waren alle Intensitäten bei allen Differenzierungsgraden vertreten (Abb.24).

Die Verhältnisse, die bei zunehmender Entdifferenzierung herrschten, ließen sich analog auch auf steigende Invasivitätsstadien übertragen.

Schleimbildende Karzinome waren zu 50 % negativ, nicht schleimbildende nur zu 29 %. Bei den schwach positiven Tumoren hatten die nichtmucinösen Karzinome einen höheren relativen Anteil, die beiden intensiver angefärbten Gruppen waren bei beiden Tumorformen gleich verteilt.

Die Tumorlokalisation zeigte keinen Einfluß auf die Reaktionsintensität.

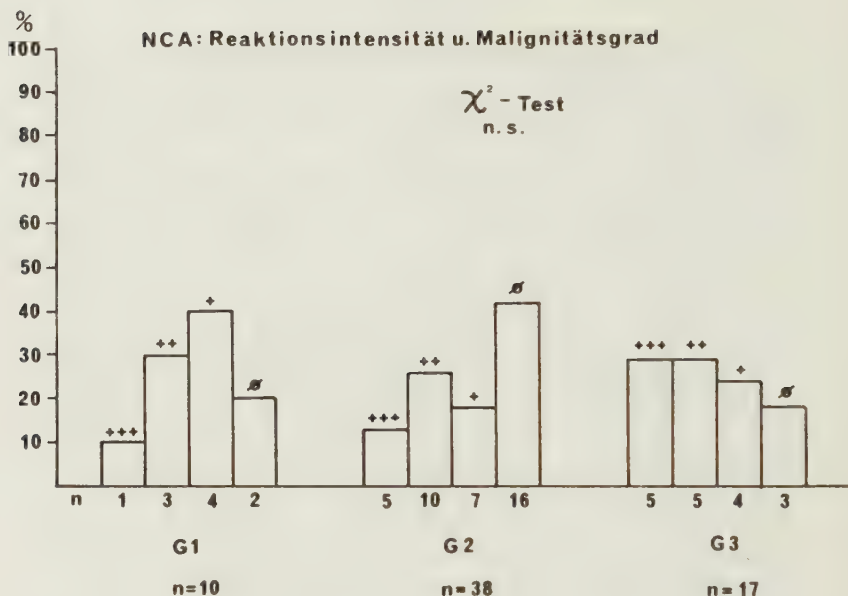


Abb.24: NCA: Korrelation des Tumordifferenzierungsgrades und der Reaktionsintensität. G 1 = gut -, G 2 = mäßig -, G 3 = gering differenziert. +++ bis 0 = Reaktionsintensität

Die Nekrosen hatten bei NCA ein etwas anderes Färbeverhalten als bei CEA. Intraglanduläres Material wies häufig eine insgesamt schwächere Intensität als der Tumorverband auf. Oft lagen in den Nekrosen einzelne intakte Zellen, die sehr wahrscheinlich keine Tumorzellen darstellten. Sie waren intensiv reagierend. Möglicherweise handelte es sich hierbei ebenfalls um Histiozyten.

Um diese Frage weiter abzuklären, wurden einige Tumoren mit dem Mesenchym-assoziierten Antigen Lysozym markiert. Dabei ließen sich die unbekannten Zellen mit diesem Antigen teilweise darstellen. Tumorzellen im Verband blieben negativ. Eine mesenchymale Herkunft der Zellen wäre somit denkbar.

4.4. TPA

4.4.1. Normale Mukosa

Bei allen 65 Präparaten erwies sich die gesunde Mukosa als TPA-reaktiv. 81 % der Fälle zeigten stark (+++), 19 % der Fälle zeigten mäßig (++) angefärbte Epithelzellen. Sowohl Saum- als auch Becherzellen reagierten deutlich. Der Becherzellschleim war negativ, häufig zog aber eine TPA-"Brücke" über die Becherzelle am oberen Pol. Die Färbung war dabei sowohl an der intestinalen Oberfläche als auch in der Tiefe der Krypten nachzuweisen (Abb.25). Bei einigen Fällen nahm die Intensität von der Darmoberfläche zur Kryptenbasis ab. Gelegentlich lagen an der Kryptenbasis ungefärbte und stark positive Epithelien nebeneinander.

Grundsätzlich ließen sich zwei Haupttypen des Färbemusters unterscheiden: Einmal der Membran-Typ, bei dem TPA an der Zellmembran konzentriert erschien. Die Kondensation war entweder apikal bzw. basal in der Zelle oder ringförmig entlang der gesamten Zellmembran zu sehen. Die Glycokalix war, nach lichtmikroskopischen Kriterien, frei von TPA.

Zum anderen konnte ein Zytoplasma-Typ abgegrenzt werden. Bei ihm lag TPA entweder diffus im Zytoplasma oder es war diffus verteilt mit geringer Membrankondensation. Der Membrantyp war mit 83 % der Fälle das bei weitem vorherrschende Muster.

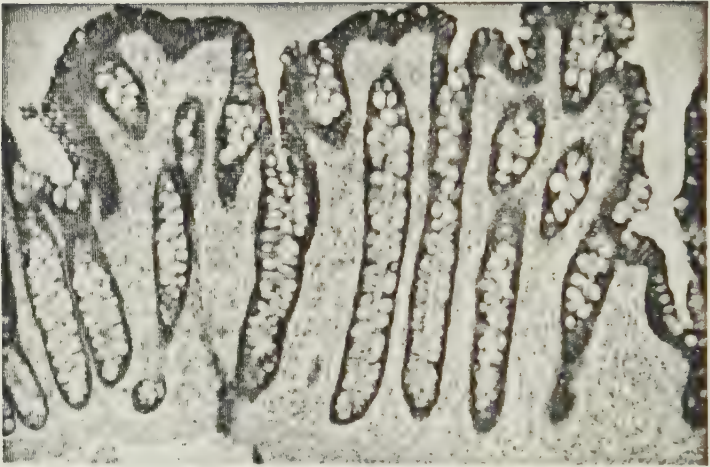


Abb.25: TPA: normale Mukosa.
Es überwiegt der Membrantyp. TPA ist bis in
die Tiefe der Krypten nachweisbar.
(Vergr. 1:125).

4.4.2. An den Tumor angrenzende gesunde Schleimhaut
(adjacent mucosa)

An dieser Schleimhautlokalisation war die Färbeintensität bei 48 Fällen gleich, bei 5 Fällen stärker und bei 12 Fällen schwächer als im gesunden Epithel. Der Unterschied zwischen normaler und "adjacent mucosa" war statistisch nicht signifikant.

Auch in Hinblick auf das Reaktionsmuster unterschieden sich normale und adjacent mucosa nicht signifikant.

4.4.3. Karzinome

4.4.3.1. Allgemeine Beobachtungen

Bei der immunhistochemischen Anfärbung mit aTPA erwiesen sich die kolorektalen Karzinome als sehr homogen. Färbintensität und Muster schwankten nur in wenigen Fällen stärker (7 Fälle zeigten drei oder mehr Färbeintensitäten gleichzeitig, 12 Fälle hatten in größeren Anteilen verschiedene Färbemuster). Diese Schwankungen traten vor allem bei G 3-Tumoren, bei Tumoren mit verschiedenen differenzierten Anteilen, bei schleimbildenden Karzinomen sowie bei gleichzeitigem Vorliegen von Tumoreinzelzellen und Zellverbänden auf. Eine eindeutige Klassifikation war aber immer möglich.

TPA war in allen Karzinomen in der Mehrzahl der Zellen nachzuweisen. Es unterscheidet sich damit deutlich von CEA und NCA.

Nach immunhistochemischen Kriterien bestand keine Korrelation von Reaktionsintensität oder Typ zwischen Karzinom- und normalen Epithelzellen jeweils desselben Patienten.

Der Schleim von mucinösen Adenokarzinomen zeigte sowohl intra- als auch extrazellulär in keinem Fall eine Farb-reaktion.

Mitotische Zellen wiesen eine nur schwache Anfärbbarkeit auf, die sich auf einen schmalen Saum an der Zellmembran beschränkte.

4.4.3.2. Reaktionsintensität

Kein Karzinom wurde als nicht reaktiv klassifiziert. Die drei Intensitätsabstufungen wiesen aber eine differente Verteilung auf.

G 1-Tumoren zeigten in 80 % eine starke, in 20 % eine mäßige Anfärbbarkeit. Mit zunehmender Entdifferenzierung verschoben sich die Intensitätswerte von stark nach schwach positiv. Bei den G 3-Karzinomen waren nur noch 29 % stark, aber 53 % mäßig und 18 % schwach positiv. Diese Tendenz war signifikant ($p < 0,05$). Einzelheiten sind der Abb.26 zu entnehmen.

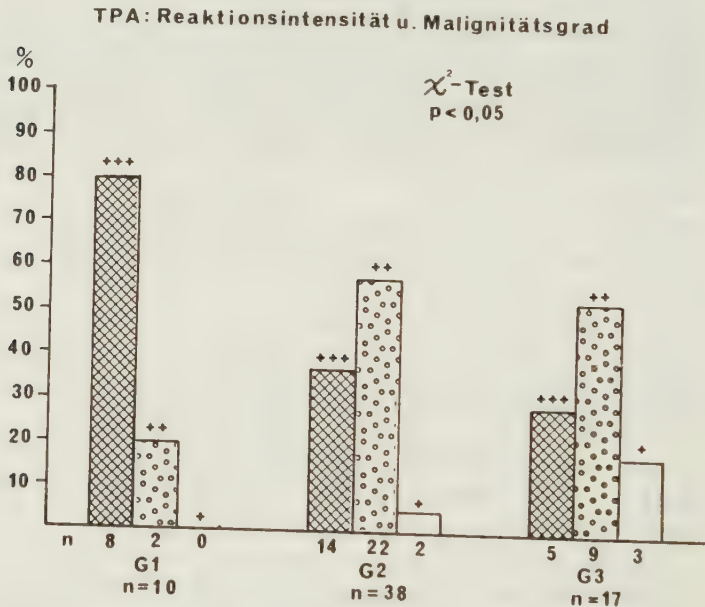


Abb.26: TPA: Korrelation von Tumordifferenzierungsgrad mit der Reaktionsintensität.
G 1 = gut-, G 2 = mäßig, G 3 = gering differenziert. *** = stark, ** = mäßig, + schwach reaktiv.

Diese Beobachtung trifft nicht nur für alle Tumoren global zu, sondern gilt auch in ein und demselben Präparat. Schlechter differenzierte Tumoranteile färbten sich weniger stark an als gut differenzierte Areale des gleichen Tumors.

Neben der Verschiebung der Intensität bei G 2- und G 3-Tumoren zu geringen Werten hin, fiel zusätzlich auf, daß die schlecht differenzierten Tumoren eine größere Variabilität (+ bis +++) aufwiesen als die G 1-Karzinome. Bei Betrachtung des Tumorstadiums (Dukes) ließ sich eine ähnliche, wenn auch nicht signifikante, Tendenz erkennen: Mit zunehmender Infiltrationstiefe, bzw. bei Vorliegen von Lymphknotenmetastasen, traten vermehrt schwächer gefärbte Karzinome auf (Abb.27).

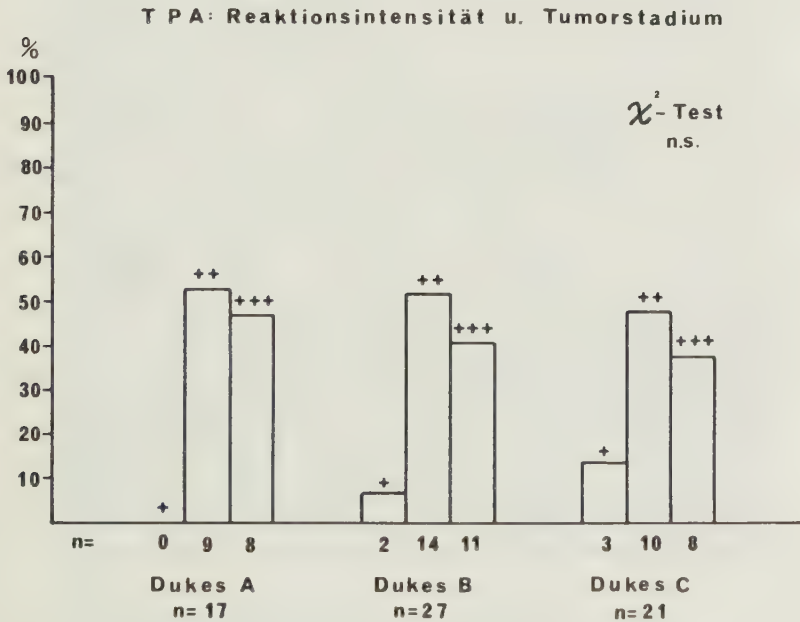


Abb.27: TPA: Korrelation der Tumordinvasion mit der Reaktionsintensität.
Dukes A - C = Tumordinvasion, + bis +++ = Reaktionsintensität.

Die Fähigkeit von Karzinomen, Schleim zu bilden, hatte keinerlei Einfluß auf die Färbeintensität. Die Verteilung der Anfärbbarkeit war bei muzinösen und nicht-muzinösen Tumoren gleich. Die Lage der Tumoren in den verschiedenen Darmabschnitten hatte keine Auswirkung auf das Färbeverhalten.

Unabhängig von der sonst vorherrschenden Reaktionsintensität war an der Invasionsfront von Zellverbänden (Abb.28) oder bei einzelnen infiltrierenden Zellen eine durchweg starke (+++) Reaktion zu vermerken. Ebenfalls intensiv angefärbt waren Zellgruppen, die "Knospungszentren" bildeten, von denen invasive Epithelien möglicherweise ihren Ursprung genommen hatten.

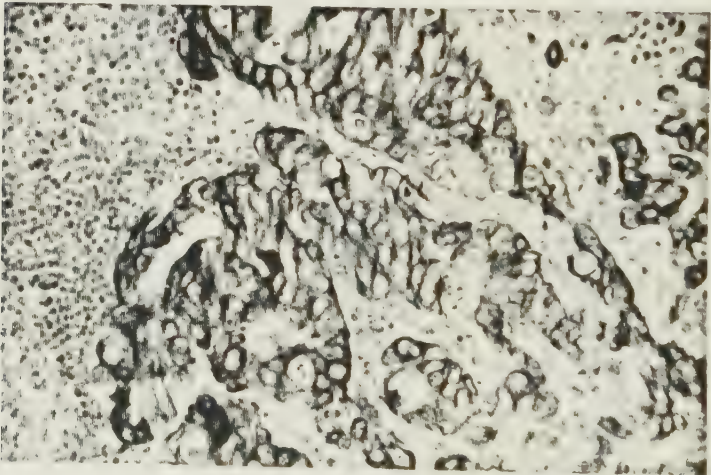


Abb.28: TPA: An der Invasionsfront (links) zeigt der Tumor eine deutliche Zunahme der Reaktionsintensität. (Vergr.1:400)

Gelegentlich konnte auch bei TPA das Phänomen beobachtet werden, daß stark positive und einzelne negative Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft lagen (Abb.29).

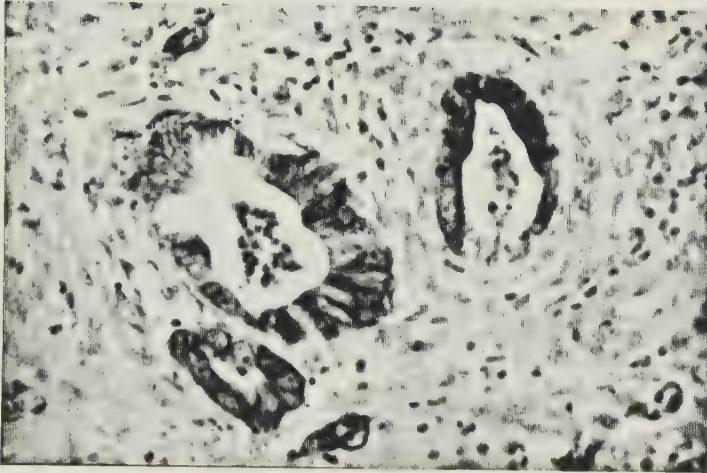


Abb.29: TPA: Zytoplasmatisches Muster. Einzelzellunterschiede benachbarter Tumorzellen. (Vergr. 1:225)

4.4.3.3. Reaktionstypen

Die beiden Haupttypen, die für die normale Mukosa beschrieben wurden, waren auch bei den Karzinomen anzutreffen (Abb.29 und 30).

Bei starker Vergrößerung betrachtet, lag TPA beim Zytoplasmatyp nicht völlig gleichmäßig in der Zelle verteilt, sondern wies ein feines filiäres Muster auf, so daß sich insgesamt ein Netzwerk darstellte (Abb. 32). Diese fadenförmigen Strukturen kondensierten beim Membrantyp an der Zellwand, das restliche Zytoplasma blieb TPA-frei.

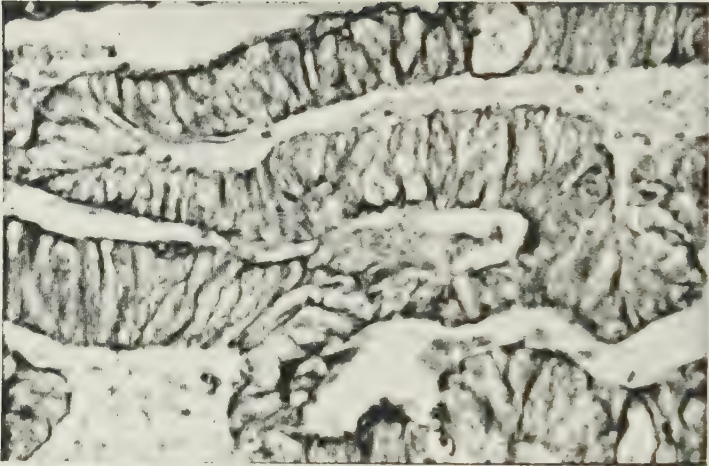


Abb.30: TPA: Membrantyp. Ein G 2-Tumor zeigt TPA nicht diffus intrazytoplasmatisch, sondern an der Zellmembran der Epithelzellen. (Vergr.1:400)

G 1-Tumoren waren in 90 % vom Membrantyp, nur ein Karzinom hatte ein zytoplasmatisches Muster. Damit zeigten die G 1- Karzinome eine ähnliche Verteilung wie die normale Mukosa. Mit zunehmender Entdifferenzierung nahm der Zytoplasmotyp zu, so daß schließlich bei den G 3-Tumoren 59 % der Fälle diese Muster zeigten, aber nur noch 41 % den Membrantyp (Abb. 31). Diese Veränderungen waren statistisch signifikant ($p < 0,05$).

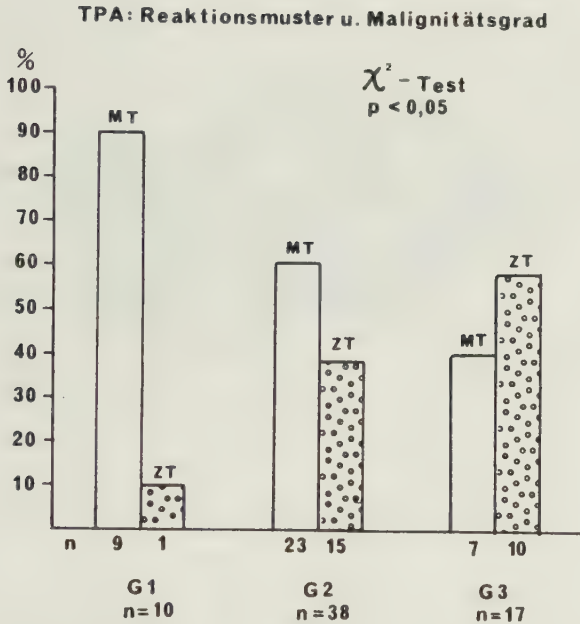


Abb.31: TPA: Korrelation des Tumordifferenzierungsgrades mit dem Reaktionstyp. G 1 bis G 3 = Differenzierungsgrad. MT = Membrantyp, ZT = Zytoplasmatyp.

Wiederum ließ sich diese Beobachtung auch in ein und demselben Präparat nachvollziehen. Auch bei G 1- und vor allem bei den G 2-Tumoren zeigten die entdifferenzierten Areale oft den Zytoplasmatyp, während der Haupttumor vom Membrantyp war. G 3-Karzinome wiesen generell eine größere Variationsbreite im Reaktionsmuster auf, als die besser differenzierten. Bei den G 3-Tumoren konnte in einzelnen Zellen noch ein zusätzliches Reaktionsmuster identifiziert werden: TPA konzentrierte sich perinukleär, ließ aber das restliche Zytoplasma weitgehend frei.

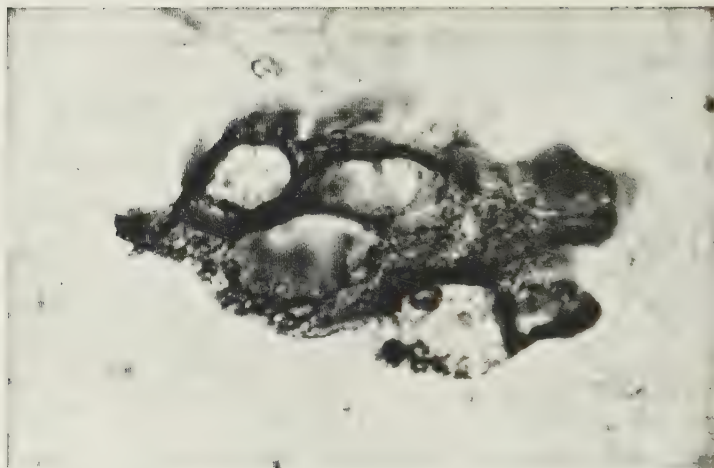


Abb.32: TPA: Feinstruktur. TPA bildet eine netzige Struktur aus. (Vergr.1:600).

Das Tumorstadium ließ eine ähnliche, allerdings nicht signifikante, Tendenz erkennen. Bei zunehmender Infiltration des Karzinoms in die Tiefe war ein Wechsel vom Membran- eher zum Zytoplasmatyp hin festzustellen.

Schleimbildende Karzinome wiesen eine nahezu identische Verteilung des Färbetyps auf wie nicht-schleimbildende. Einzelne, in Schleimseen gelegene Zellen, zeigten eine starke zytoplasmatische Reaktion.

Die Lokalisation der Tumoren im Darm hatte keinen signifikanten Einfluß auf den Reaktionstyp.

Die Invasionsfront des Tumors, besonders aber einzeln infiltrierende Zellen, hatten bevorzugt ein zytoplasmatisches Muster.

4.4.3.4. TPA außerhalb von Tumorzellen

Im Gegensatz zu CEA wurde TPA außerhalb von vitalen Tumorzellen nur selten angetroffen. Folgende Phänomene konnten

beobachtet werden:

Nekrotisches Material, im Drüsenlumen oder außerhalb, war praktisch ohne Reaktion. Nur bei nekrotischen Zellen, deren Kerne noch einigermaßen gut auszumachen waren, ließ sich noch etwas TPA nachweisen. Waren die Kerne nicht mehr zu erkennen, blieb auch das nekrotische Material negativ (Abb.33).

Bei sehr starker Vergrößerung wurden gelegentlich kleine TPA-Granula in der Nekrose gesehen.

Ähnliche Tumormarkerdepots konnten auch an der Invasionsfront des Tumors und in der Umgebung von sich auflösenden Zellverbänden beobachtet werden.

Ein Anhalt für Phagozytose von TPA ließ sich nicht finden. Granulozyten und Histozyten zeigten durchwegs eine negative Reaktion, selbst in unmittelbarer Tumornachbarschaft.

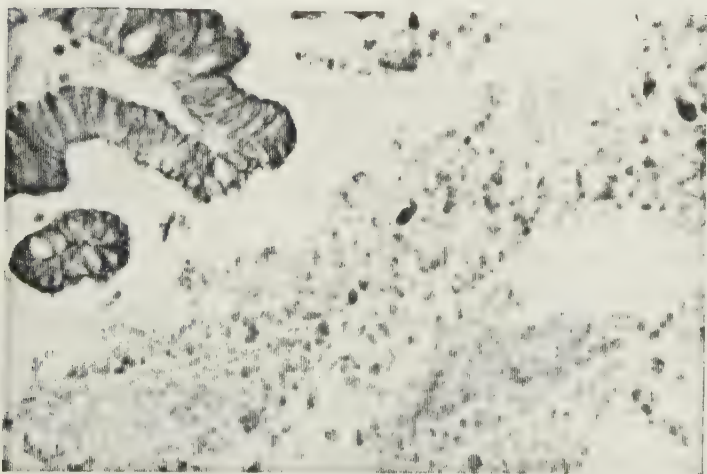


Abb.33: TPA: In den nekrotischen Arealen verschwindet TPA mit dem Fehlen der Kernreaktion. (Vergr.1:400)

4.5. Tumorassozierte Antigene im Vergleich

Einige neue Gesichtspunkte ergaben sich bei Betrachtung der drei Marker jeweils bei ein und demselben Tumor im Vergleich (Tab.5).

Die CEA-Reaktion war bei diesem Vergleich in Bezug auf die NCA-Reaktion in vier Fällen schwächer, 42 Male stärker und in 19 Fällen gleich reaktiv wie diese. Die CEA-Reaktion war 20 Male schwächer, in 19 Fällen stärker und bei 26 Präparaten gleich intensiv wie die TPA-Reaktion.

NCA-Tumoren waren in 46 Fällen schwächer, in neun Fällen stärker und in zehn Präparaten gleich reaktiv wie bei der Reaktion mit aTPA.

Nur bei sechs Präparaten waren etwa gleich starke Reaktionen bei allen drei Antigenen anzutreffen (Nr. 29, 40, 45, 53, 63, 64). Alle mit aCEA oder anCA negativ reagierenden Tumoren waren mit aTPA positiv. Diese Aussage traf auch für viele CEA- und NCA-negative Tumorteile zu. Umgekehrt gab es aber auch TPA-negative Areale eines Karzinoms, die sich mit aCEA darstellen ließen. Die Farb-reaktion mit aTPA ergab insgesamt ein "klareres Bild" als die Darstellungen mit anCA und aCEA. Dies war vor allem auf die fehlende Reaktion von nekrotischem Gewebe mit aTPA zurückzuführen.

Bei 22 Fällen zeigte sich bei der Anfärbung mit aCEA bzw. anCA ein identischer Reaktionstyp: fünf waren gemeinsam negativ, sieben hatten eine polare Komponente, 10 waren gemeinsam zytoplasmatisch. In 16 Fällen waren mit anCA angefärbte Tumoren negativ, wenn die mit aCEA reagierenden Karzinome andere Typen zeigten. Bei drei Tumoren waren Karzinome bei anCA eher polar reagierend, während die zugehörigen Karzinome mit aCEA vom Zytoplasmatyp waren. Bei 24 Tumoren galten genau die umgekehrten Verhältnisse.

22 Karzinome hatten mit aCEA und aTPA ein analoges Reaktionsmuster. In acht Fällen war dies der Zytoplasmotyp, bei 14 Präparaten der Luminal- bzw. Membrantyp. 17 Karzinome waren mit aTPA eher zytoplasmatisch reaktiv, im Gegensatz zu den korrespondierenden CEA-Reaktionen, die polare Typen zeigten. Bei 26 Karzinomen waren die Verhältnisse umgekehrt.

Bei 13 Fällen waren TPA- und NCA-Tumoren gleich zytoplasmatisch, bei fünf gleich luminal bzw. membranös. NCA-Karzinome waren bei drei Fällen von polarer, bei 23 von zytoplasmatischer Reaktion, während die entsprechenden Tumoren mit aTPA das entgegengesetzte Muster hatten. 21 TPA-reaktive Präparate waren NCA-negativ. 10 Präparate wiesen bei den drei Antigenen ein korrespondierendes Muster auf (Nr. 6, 8, 11, 16, 40, 45, 62, 63, 64, 65).

Tabelle 5:

Immunhistochemische Charakteristikal von 65 kolorektalen Karzinomen

Karzinom			Tumorassoziiertes Antigen							
			CEA			NCA		TPA		
			Intens.	Typ	Serum	Intens.	Typ	Intens.	Typ	
1	C	2	+++	zyt	< 2,0	++	zyt	+++	mem	
2	B	3	++	mi	< 2,0	+	lum	++	mem	
3	B	3	++	lum	< 2,0	+	mi	++	mem	
4	A	2	++	lum	< 2,0	++	zyt	+++	mem	
5	C	2	+++	api	14,0	++	zyt	++	mem	
6	B	2	+++	zyt	< 2,0	+++	zyt	++	zyt	
7	A	2	Ø	Ø	< 2,0	++	zyt	++	mem	
8	B	2	+++	lum	3,8	++	lum	+++	mem	
9	A	2	++	lum	13,0	Ø	Ø	++	zyt	
10	B	2	+++	lum	< 2,0	Ø	Ø	++	zyt	
11	A	2	+++	lum	< 2,0	+	lum	++	mem	
12	A	2	++	zyt	< 2,0	Ø	Ø	+++	mem	
13	B	2	+++	api	< 2,0	++	zyt	+	mem	
14	C	2	++	mi	10,0	+	mi	+++	zyt	
15	A	2	++	zyt	< 2,0	Ø	Ø	++	zyt	
16	B	2	+++	zyt	13,0	+	zyt	+++	zyt	
17	C	2	Ø	Ø	< 2,0	Ø	Ø	++	zyt	
18	A	2	+++	lum	< 2,0	+	mi	++	mem	
19	A	3	Ø	Ø	< 2,0	Ø	Ø	++	mem	
20	C	2	++	lum	40,0	Ø	Ø	++	mem	
21	C	2	++	zyt	< 2,0	Ø	Ø	+++	zyt	
22	B	2	+++	mi	3,7	++	zyt	++	mem	
23	C	2	++	zyt	< 2,0	+	mi	++	mem	
24	B	3	+++	mi	3,7	++	zyt	+++	zyt	
25	B	3	+++	mi	3,2	++	zyt	+++	zyt	
26	A	2	+	lum	< 2,0	Ø	Ø	++	zyt	
27	C	2	+	zyt	< 2,0	Ø	Ø	+++	mem	
28	A	3	++	lum	< 2,0	+	zyt	+++	mem	
29	A	2	+++	mi	3,5	+++	zyt	+++	mem	
30	B	2	++	api	< 2,0	Ø	Ø	++	mem	
31	C	2	++	lum	< 2,0	Ø	Ø	++	zyt	
32	B	2	++	api	7,6	+	zyt	++	zyt	
33	B	2	+++	lum	4,1	++	mi	++	mem	
34	B	3	Ø	Ø	< 2,0	Ø	Ø	+	zyt	

Tabelle 5 (Fortsetzung)

Karzinom			Tumorassoziiertes Antigen							
			CEA			NCA			TPA	
			Intens.	Typ	Serum	Intens.	Typ		Intens.	Typ
35	B	1	+++	lum	-	++	mi		+++	mem
36	C	1	+++	zyt	-	+	zyt		+++	mem
37	B	1	+	api	-	+	zyt		+++	mem
38	A	1	+++	mi	-	++	zyt		+++	mem
39	C	1	+++	mi	-	++	zyt		+++	zyt
40	A	1	+++	lum	-	+++	lum		+++	mem
41	C	1	+++	mi	-	+	zyt		+++	mem
42	B	1	+++	lum	-	Ø	Ø		++	mem
43	B	1	++	mi	-	+	zyt		+++	mem
44	B	1	+++	mi	-	Ø	Ø		++	mem
45	B	2	+++	lum	-	+++	lum		+++	mem
46	B	2	Ø	Ø	-	++	zyt		+++	mem
47	A	2	Ø	Ø	-	Ø	Ø		+++	mem
48	A	2	+	zyt	-	Ø	Ø		+++	mem
49	A	2	+++	api	-	+	zyt		++	zyt
50	A	2	+++	lum	-	Ø	Ø		++	mem
51	B	2	+++	lum	-	Ø	Ø		++	mem
52	B	2	+	api	-	Ø	Ø		++	zyt
53	B	2	+++	mi	-	+++	zyt		+++	zyt
54	C	2	++	mi	-	++	mi		+	mem
55	B	2	+++	lum	-	+++	lum		++	zyt
56	C	3	+	zyt	-	++	zyt		+++	mem
57	C	3	Ø	Ø	-	Ø	Ø		+	zyt
58	B	3	++	zyt	-	+	zyt		++	mem
59	C	3	+++	lum	-	+++	mi		++	zyt
60	C	3	+++	mi	-	+++	zyt		++	zyt
61	C	3	+++	zyt	-	+++	mi		++	mem
62	C	3	+	zyt	-	+++	zyt		++	zyt
63	C	3	++	zyt	-	++	zyt		++	zyt
64	B	3	+++	zyt	-	+++	zyt		+++	zyt
65	C	3	+++	zyt	-	++	zyt		+	zyt

Nr. = Karzinomnummer
 St. = Tumorstadium n. Dukes
 Diff. = Differenzierungsgrad
 Intens. = Reaktionsintensität
 Typ = Reaktionstyp
 Serum = Serumspiegel

lum = luminaler Typ
 zyt = zytoplasmatischer Typ
 mi = Mischtyp
 api = apikaler Typ
 mem = Membrantyp
 Ø = nicht reaktiv

5. DISKUSSION

5.1. Darstellung von kolorektalen Karzinomen mit der indirekten Immunperoxidase-Technik

Die vorliegenden Versuche wurden mit Hilfe der i n d i -
r e k t e n I m m u n p e r o x i d a s e (IPO)-Technik
durchgeführt.

Die IPO-Technik war an den Routinepräparaten (Fixation in
10% Formalin, Paraffineinbettung) gut durchführbar. Bei
allen drei Antigenen (CEA, NCA und TPA) erwies sie sich
als weitgehend artefaktfrei und lieferte gut auswertbare
Farbreaktionen.

Durch den analogen Versuchsaufbau bei allen Markern war
auch ein Vergleich untereinander gut möglich.

Ein wesentlicher Faktor für das Zustandekommen optimaler
Farbreaktionen war das exakte Austesten von Antiserum-
konzentrationen und Reaktionszeiten, die in ausgedehnten
Vorversuchen festgelegt wurden.

Alle drei Antigene zeigten die gesamte Breite der In-
tensitätsskala, technikbedingte Häufungen einer Reak-
tionsintensität wurden nicht beobachtet. Durch die si-
multane Mitbewertung von Kontrollen bei jedem Versuchs-
tag konnten methodische Schwankungen der Reaktion aus-
geschlossen werden.

Da auch in Tumorearealen mit stark positiver Reaktion
keine Hintergrundreaktion zu verzeichnen war und ande-
rerseits Einzelzellen in schwach positiven Arealen z.T.
sehr intensiv gefärbt waren, konnten die Intensitäts-
abstufungen als echt bewertet werden.

Besondere Aufmerksamkeit wurde der S p e z i f i t ä t der A n t i s e r e n gewidmet. Kommerziell erhältliches aCEA (Dakopatts) zeigte starke Kreuzreaktion mit NCA-Epitopen, wie an Granulozyten (Burtin et al. 1975) demonstriert werden konnte. Nach Absorption des aCEA-Antiserum an Lungengewebe reagierten die Granulozyten als NCA-Indikatoren nicht mehr. Eine Fehlerquelle, die möglicherweise für kontroverse Befunde verantwortlich ist, konnte damit beseitigt werden.

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit ein eigenes Modell vorgestellt, mit dem CEA und kreuzreagierende Antigene anhand von histologischen Präparaten auf ihre Spezifität hin überprüft werden konnten. Die ungenügende Absorption eines aBGP-Antiserums konnte durch dieses Verfahren aufgedeckt werden und fand später in der Doppeldiffusionstechnik ihre Bestätigung (Lamerz, persönliche Mitteilung).

Die IPO-Technik wurde in der vorliegenden Arbeit mit p o l y k l o n a l e n A n t i k ö r p e r n durchgeführt. Diese waren immunologisch und immunhistochemisch gut definiert. Diese Forderung nach genauer Charakterisierung ist aber auch für monoklonale Antikörper zu erheben, da diese nicht automatisch auch monospezifisch sind. Da monoklonale Antikörper nur einen sehr eng umschriebenen Epitopbereich erkennen können, erscheint ihre Anwendung bei einem relativ heterogenen Antigen wie CEA nicht unproblematisch (Leathem et al. 1981, Primus et al. 1983). So war z.B. bei der Erkennung von kolorektalen Karzinomen mit der Durchflußzytometrie ein monoklonales Antiserum dem auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten polyklonalen Antiserum unterlegen (Valet et al. 1984). Trotz der unbestrittenen Vorteile monoklonaler Antikörper sollte bei der immunhistochemischen Darstellung von CEA und assoziierter Antigene zumindest beim derzeitigen Stand nicht auf den Einsatz gut definierter polyklonaler Antiseren verzichtet werden.

5.2. Gesunde Kolonmukosa

Die morphologisch intakte Mukosa zeigte bei allen drei untersuchten Antigenen Fälle mit positiver Reaktion. Am stärksten war dies bei TPA der Fall: 80 % der Reaktionsränder reagierten stark positiv, der Rest mäßig oder schwach, negative Fälle waren nicht vertreten. Dieser Befund steht im Widerspruch zu der zunächst vermuteten Tumorspezifität von TPA (Björklund und Björklund 1957, Björklund 1981), befindet sich aber in Übereinstimmung mit neueren Untersuchungen (Nathrath et al. 1985).

Als "Normtyp" der gesunden Kolonmukosa ließ sich der beschriebene Membrantyp angeben, bei dem TPA an der Zellmembran kondensiert war.

Die Anwesenheit von CEA in der normalen Mucosa wurde lange Zeit verneint (Denk et al. 1972, Primus et al. 1975, Goldenberg et al. 1976), ist heute wohl aber hinreichend nachgewiesen (Burtin et al. 1973 b, Huitric et al. 1976, Wagener und Breuer 1977, Wagener et al. 1981 a, O'Brien et al. 1981, Ahnen et al. 1982, Nap et al. 1983).

Möglicherweise sind die divergierenden Befunde auf technische Probleme zurückzuführen. Bei ausgereifter Methodik können auch höhere Antikörperkonzentrationen verwendet werden, ohne daß eine störende Hintergrundreaktion auftritt. In eigenen Versuchen konnte gezeigt werden, daß die Anfärbbarkeit der normalen Mukosa für CEA in einem engen Bereich konzentrationsabhängig ist.

Als "Normtyp" kann wohl bei CEA in der gesunden Mucosa der beschriebene Luminaltyp angesehen werden. Ein ähnliches Muster wurde von Wagener et al. (1978) angegeben. Huitric et al. (1976) sowie Ahnen et al. (1982) beschrie-

ben eine Lokalisation von CEA an der apikalen Zelloberfläche und in granulärer Form intrazellulär. Den intrazellulären Strukturen könnten gut die hier beschriebenen feinen zytoplasmatischen Depots entsprechen.

NCA konnte in der normalen Mukosa nur in der Hälfte der Fälle nachgewiesen werden. Durch Konzentrationsveränderungen der Antiseren ließ sich die Rate an positiven Fällen nicht erhöhen.

Diese Ergebnisse stimmen nicht mit den Befunden von Darcy und Mitarbeitern (1973) überein, wonach NCA in der normalen Kolonmukosa in größeren Mengen vorkommt als CEA. Burtin et. al (1973 b) sowie v.Kleist (1973) geben für NCA ein ähnliches Reaktionsmuster an wie für CEA. Die vorliegenden Befunde bestätigen diese Beobachtungen in einigen Fällen, widersprechen ihnen aber in sofern, als bei NCA sehr viel häufiger der Zytoplasmotyp gefunden wurde als bei CEA. Möglicherweise unterscheiden sich NCA und CEA doch stärker als bisher angenommen.

Bei der Darstellung der normalen Mukosa mit aCEA, etwas weniger ausgeprägt mit aTPA, fiel eine Abnahme der Anfärbbarkeit der Zellen von den oberen Kryptenanteilen zur Kryptenbasis hin auf. Da im unteren Drittel der Krypten die Proliferationszone liegt, die Ausreifung der Epithelien aber zur Darmoberfläche hin erfolgt (Eder 1966), könnten die beiden Antigene eher mit Differenzierung als mit Proliferation in Zusammenhang zu bringen sein. Das Nebeneinander von negativen und positiven Zellen bei TPA wäre dann vereinbar mit dem Vorkommen von undifferenzierten und sich differenzierenden Epithelzellen in dieser Region.

5.3. Adjacent mucosa

Die an den Tumor angrenzende Schleimhaut, die "adjacent mucosa" oder "transitional mucosa", zeichnete sich durch Zunahme der Kryptentiefe, sowie Schlängelung und Aufzweigung der Krypten aus. Bei der Reaktion mit aCEA ließ sich eine Zunahme des Prozentsatzes reagierender Zellen und eine Zunahme der zytoplasmatischen gegenüber der luminalen Anfärbbarkeit zeigen. Diese Ergebnisse erweitern früher gemachte Beobachtungen (Csaszar et al. 1978) die nur eine leichte Zunahme der Abfärbbarkeit verzeichnen, ohne hier genauer zu differenzieren.

Die Veränderungen von TPA und NCA gingen in der Transitionalschleimhaut in die gleiche Richtung wie bei CEA, waren aber nicht so ausgeprägt.

Es ist bekannt, daß die adjacent mucosa neben morphologischen auch funktionelle Besonderheiten aufweist (Filipe und Branfoot 1974, Dawson und Filipe 1976). In diesen Zusammenhang könnten auch die Veränderungen in der Antigenexpression von CEA, NCA und TPA passen. Dabei bleibt aber offen, ob diese Veränderungen Ausdruck einer Präkanzerose (Filipe et al. 1981) sind oder vielmehr ein reaktives Geschehen darstellen, da die adjacent mucosa nicht ohne weiteres mit der hyperplastischen Schleimhaut bei der experimentellen Karzinogenese vergleichbar ist (Wiebecke et al. 1973 und 1974).

5.4. Karzinome

Die untersuchten Karzinomabschnitte zeigten bei CEA und etwas weniger ausgeprägt bei NCA mehr Antigen-positive Zellen und eine im Durchschnitt höhere Antigenintensität als normale oder adjacent mucosa. Diese Befunde stimmen gut mit Messungen von CEA an Tumor- bzw. normalen Epithelzellen überein (Valet et al. 1984). Dabei waren die Unterschiede zwischen normaler Mukosa und Transitional-

schleimhaut geringer, als die zwischen adjacent mucosa und Karzinom.

Ein etwas anderes Verhalten war bei TPA zu beobachten. Die Zahl der positiven Zellen nahm bei den Karzinomen im Vergleich mit gesunder Schleimhaut zu, die Reaktionsintensität der Tumorzellen war aber im Durchschnitt nicht stärker ausgeprägt als in der normalen oder adjacent mucosa. Dennoch haben Lüthgens und Schlegel (1981) bei kolorektalen Karzinomen erhöhte TPA-Serumspiegel beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit wurden für alle drei Antigene **R e a k t i o n s m u s t e r** angegeben.

Reaktionsmuster für TPA wurden bei kolorektalen Karzinomen bisher noch nicht beschrieben. Für CEA wurden schon früher (Bordes et al. 1973, Rogalsky 1975, O'Brien et al. 1981) Färbemuster angegeben. Hierbei wurde aber nicht immer zwischen intra- und extrazellulärem CEA unterschieden. Das luminale Muster wurde von den Autoren übereinstimmend gesehen, die weitere Unterteilung in einen Apikaltyp und den echten Luminaltyp aber nicht gemacht. Die Existenz eines Zytoplasmatypes wurde verschiedentlich bestritten (Burtin et al. 1973 b, Primus et al. 1975, Goldenberg et al. 1976), stellt aber keinen Artefakt dar, da die Kernregion regelmäßig frei von CEA bleibt (Wagener et al. 1978).

Verschiedene Untersucher kamen nun bei der Betrachtung von CEA-Antigenexpression und Differenzierungsgrad zu einander widersprechenden Ergebnissen. Zamcheck et al. (1975) sahen eine Abnahme der CEA-Reaktivität mit zunehmender Entdifferenzierung, Goldenberg und Mitarbeiter (1976) fanden G 3-Tumoren überwiegend negativ. Dagegen verzeichneten Bordes et al. (1973) sowie Pihl und Mitarbeiter (1980) eine Zunahme der Antigenreaktion bei zunehmender Entdifferenzierung. Rogalsky (1975) fand G 3-Tumoren überwiegend CEA-reaktiv. In der vorliegenden Arbeit konnten Hinweise für eine Erklärungsmöglichkeit der widersprüchlichen Situation gefunden werden:

Mit zunehmender Entdifferenzierung konnte bei CEA eine Verschiebung des Reaktionsmusters vom Luminal- zum Zytoplasmatyp demonstriert werden. Mit dem Verlust der normalen Drüsenstruktur ging auch ein Verlust des normalen Reaktionsmusters einher. Wahrscheinlich liegt hier eine Störung des Ausschleusungsmechanismus vom Golgi-Apparat zur luminalen Zelloberfläche bei veränderter Organarchitektur vor. Ahnen und Mitarbeiter (1982) nehmen hierbei einen Verlust der Polarität der entdifferenzierten Tumorzelle an. Diese Hypothese wird noch durch die eigene Beobachtung unterstützt, daß bei Verlust des Kontaktes der Tumorzellen untereinander bei CEA ein Wandel vom Luminal- zum Zytoplasmatyp eintritt.

Eine zweite Tendenz war die Eigenschaft, daß schlecht differenzierte Tumoren CEA z.T. weniger oder gar nicht mehr bilden können, wodurch die höhere Rate gering positiver bzw. negativer Fälle bei G 2- und vor allem bei G 3-Tumoren, verglichen mit G 1- Karzinomen, zu erklären wäre. Das sich mit zunehmender Entdifferenzierung verändernde Reaktionsmuster von CEA könnte somit aus einer Überlagerung der beiden diskutierten Effekte resultieren. Durch eine solche "dualistische" Sichtweise ließen sich die widersprüchlichen Befunde bei entdifferenzierten Karzinomen folgendermaßen erklären:

Die Untersucher könnten je nach Patientenselektion mehr Fälle mit Tumoren, die wenig CEA produzierten oder mehr Karzinome mit Wandel zum Zytoplasmatyp (und damit einer relativen CEA-Antigendichtezunahme) in ihre Studien aufgenommen haben.

Dagegen ließ sich bei TPA ein Auftreten negativer Fälle auch bei den G 3-Tumoren nicht nachweisen.

TPA scheint eine Substanz zu sein, die auch noch in

gering differenzierten Tumorzellen gebildet wird, wenn auch in signifikant geringerem Ausmaß und in anderer zellulärer Verteilung.

Ein Nachweis von TPA in allen untersuchten Karzinomen steht dabei einer Rate von 89 % bei CEA und von 68 % bei NCA gegenüber, was sicher in Zukunft mehr Aufmerksamkeit auf das Antigen TPA lenken sollte.

TPA konnte in fast allen Tumoren im Bereich der Invasionsfront und bei infiltrierenden Einzelzellen in starker Reaktivität gesehen werden, auch wenn die Tumorzellen sonst schwächer reagierten. Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang mit der Funktion von TPA als Zytokeratin (Weber et al. 1984).

Die Darstellung der Tumoren mit aNCA-Antiserum ergab einen sehr konstanten Anteil von Fällen mit lumbalem Muster über alle Differenzierungsgrade (20 - 24 %). Der überwiegende Reaktionstyp war allerdings, wie in der normalen Mukosa, der Zytoplasmotyp. In den wenigen bisher vorliegenden Arbeiten wurde eine zytoplasmatische Lage von NCA in der gesunden Mukosa und in kolorektalen Karzinomen nicht angegeben (Burtin et al. 1973 b, Burtin 1974). Diese Unterschiede beruhen möglicherweise auf unterschiedlichen Antigenpräparationen.

Da NCA auch in mäßig oder gering differenzierten Karzinomen eine ähnliche Häufigkeitsverteilung der Reaktionstypen aufwies, wie in der gesunden Mukosa, könnte es sich hier um ein, genetisch gesehen, "stabiles" Antigen handeln, jedenfalls ergeben sich hier gewisse Unterschiede zur Verteilung der Muster von CEA, die bisher nicht registriert wurden (v. Kleist et al. 1977, Huitric et al. 1976).

Bei allen drei untersuchten Antigenen ließen sich Unterschiede im Reaktionsmuster benachbarter Karzinomzellen feststellen.

Am ausgeprägtesten war dieser Effekt bei CEA. In einzelnen Drüsenverbänden lagen stark reaktive und negative Tumorzellen unmittelbar nebeneinander, ohne daß der Tumor dadurch ein insgesamt uneinheitliches Bild ergeben hätte. Dieser Befund läßt am ehesten an Unterschiede, hervorgerufen durch differente Zellzyklusstadien denken.

Björklund (in Vorbereitung) konnte an HeLa-Zellen eine maximale TPA-Synthese in der S-Phase mit postmitotischer Abgabe von TPA zeigen. CEA wird bei einer Kolonkarzinomzelllinie hauptsächlich in der G_1 -Phase gebildet (Drewinko und Yang 1980). Es bleibt aber Spekulation, ob sich diese Ergebnisse auf Tumorzellverbände in vivo übertragen lassen.

Besondere Aufmerksamkeit wurde dem Verhalten der Antigene außerhalb von vitalen Tumorzellen gewidmet.

CEA und NCA zeigten regelmäßig eine Reaktion in solchen Tumorearealen, die ausschließlich oder überwiegend nekrotisch waren. Teilweise waren diese Bezirke stärker reaktiv als das umgebende vitale Tumorgewebe. Meist behielt die Nekrose auch das Reaktionsmuster der Tumorzellen bei (siehe 5.5.). In der Umgebung solcher Areale waren Leukozyten, die sonst nicht reagierten, CEA-positiv. Möglicherweise handelte es sich hierbei um Phagozytosevorgänge.

TPA verhielt sich in den Nekrosearealen völlig anders. Mit dem Verdämmern der Tumorzellen war auch die Reaktivität für TPA rückläufig, in komplett nekrotischen Zellen war meist kein TPA mehr nachweisbar. Ähnliche Beobachtungen machten Björklund et al. (1982) an Mammakarzinomen. Dieser Befund könnte möglicherweise als Vitalitätsnachweis von Tumorzellen eine Rolle spielen (Abb.34).

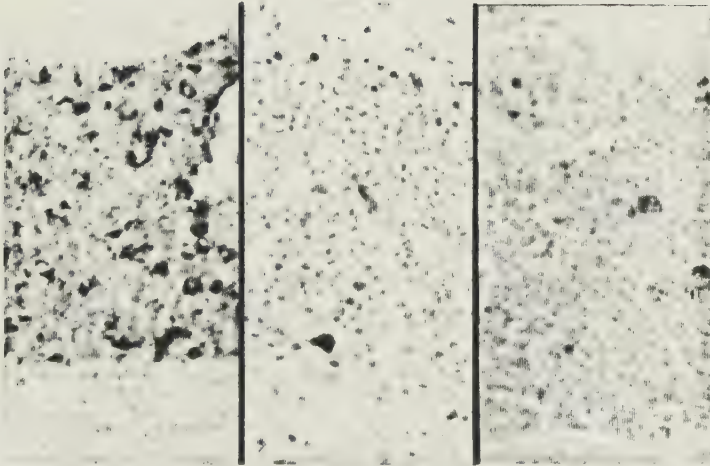


Abb.34: Nekrosefeld im Vergleich der drei Antigene.
links: CEA, Mitte: TPA, rechts: NCA.
Während bei CEA und NCA in dem Nekrosefeld eine
mäßig/starke Reaktion zu beobachten ist, ver-
schwindet bei TPA das Antigen mit zunehmender
Zellnekrotisierung (Vergr.1:120).

5.5. CEA-Immunhistochemie und CEA-Serumspiegel

Bei 13 von 33 Patienten waren präoperativ erhöhte CEA-Serumspiegel nachgewiesen worden. Die Rate von Patienten mit erhöhtem CEA-Titer wird beim Kolorektalkarzinom mit 14 bis 86 % angegeben (Übersicht bei v.Kleist 1983). Es ergibt sich damit eine Diskrepanz zwischen der positiven Immunhistochemie in der überwiegenden Mehrzahl der untersuchten Fälle und einem geringeren Prozentsatz von Patienten mit erhöhtem CEA-Serumspiegel.

In der vorliegenden Arbeit konnte in Bezug auf erhöhte Serumwerte kein Einfluß des Tumordifferenzierungsgrades nachgewiesen werden. Dieser Befund wird auch von Wiggers et al. (1983) sowie von Rognum und Mitarbeitern (1982 a) berichtet.

Der dagegen von Pihl und Mitarbeitern (1980) gefundene Zusammenhang von steigendem Serumspiegel bei zunehmender Entdifferenzierung könnte dadurch erklärt werden, daß G 3- Tumoren eher zur Tiefeninfiltration neigen als G 1- oder G 2-Karzinome. Einige Autoren (Zamcheck et al. 1975, Zamcheck 1978, Rognum et al. 1982 a) geben nämlich einen Zusammenhang von zunehmender Tumordinfiltration und steigenden CEA-Titern an.

In der vorliegenden Arbeit hatten Karzinome des Stadium Dukes B und C signifikant höhere Serumspiegel als Dukes A-Karzinome. Das Tumorstadium nach Dukes gab gleichzeitig aber auch einen Hinweis auf die totale Tumormasse, da die Tiefenausdehnung in der Regel relativ gut mit der gesamten Tumorgroße korrelierte.

Da aber eine exakte Größenbestimmung von Tumoren bzw. Operationspräparaten nur indirekt möglich ist, wurde verschiedentlich auf Tiermodelle zurückgegriffen. Hier gelang es jedoch nicht, bzw. nur für ganz limitierte Wachstumsphasen, eine Abhängigkeitsbeziehung von Tumorgroße

und CEA-Serumspiegel herzustellen (Lewis und Keep 1981, Staab und Anderer 1982).

Die Frage, ob der Seramtiter vom totalen CEA-Gehalt des Tumors abhängt, wurde zunächst bejaht (Dyce und Haverback 1974), dieser Befund konnte allerdings später nicht mehr bestätigt werden (Go et al. 1973, Khoo et al. 1973, Boyd et al. 1976, Wagener und Müller 1978, Wagener et al. 1981 b, Castelli et al. 1983).

Es sollten aber nicht nur "statische", sondern auch funktionelle Überlegungen mit in die Diskussion einbezogen werden, etwa die Frage der zellulären Antigenverteilung. Eine strenge Korrelation von immunhistochemischen Reaktionstypen und dem Verhalten des Serumspiegels konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden, allerdings waren bei Tumoren mit polarer Komponente die Serumwerte höher als bei solchen mit zytoplasmatischem Muster. Ähnliche Ergebnisse erzielten Wagener und Mitarbeiter (1981 b).

Dies hat zu der Überlegung geführt, Tumoren in sogenannte CEA-Sekretoren und Nicht-Sekretoren einzuteilen (Rognum et al. 1982 b), wobei nur bei Sekretoren erhöhte Serumspiegel zu beobachten wären.

Unabhängig von solchen Überlegungen ist aber regelmäßig auch bei Gesunden CEA, allerdings nur in geringen Mengen, im Serum nachzuweisen (Hansen et al. 1974). Diesem Befund entspricht gut die Tatsache, daß CEA auch in der normalen Kolonmukosa vorhanden ist. Unklar bleibt weiterhin, wie CEA ins Blut gelangt.

Burtin (1974) hat vorgeschlagen, erhöhte CEA-Serumspiegel von Kolonkarzinompatienten durch das Auftreten zusätzlicher CEA-Produzenten, eben der Karzinomzellen zu erklären. Angesichts der Menge normaler auch CEA-produzierender Darmepithelien fällt es schwer, diese Ansicht zu teilen. Ferner spricht auch der Befund dagegen, daß

bei Auftreten von (CEA-positiven) Adenomen des Dickdarms, in einem hohen Prozentsatz normale CEA-Serumspiegel gefunden wurden (Hansen et al. 1974, McCartney und Hoffer 1974, Martin et al. 1976). Eher liegt es nahe, die Veränderungen in der Organarchitektur und im Wachstumsverhalten zu berücksichtigen.

Ein Faktor ist sicherlich das Ausmaß der Tumervaskularisation (Zamscheck et al. 1975), ein weiterer das Auftreten von N e k r o s e n.

In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, daß es sehr wesentlich darauf ankam, wo nekrotische Areale im Tumor gelegen waren. Nur bei ZN-Arealen, die an der Invasionsfront der Tumoren mit Anschluß ans Bindegewebe lagen, war mit Signifikanz ein erhöhter Serumspiegel festzustellen, nicht dagegen bei Tumoren mit überwiegend zentralen oder intraglandulären Nekrosen, die von intaktem Tumorepithel umgeben waren. Auch Nekrosen, die zum Darmlumen hin gelegen waren, beeinflussten den Serumspiegel nicht. Von ihnen ist aber bekannt, daß sie hohe CEA-Titer im Darmsekret verursachen (Molnar et al. 1976).

Es konnte hier gezeigt werden, daß CEA den Nekrotisierungsvorgang der Tumorzellen relativ unbeschadet übersteht: ZN-Areale wiesen noch das identische Reaktionsmuster auf wie zugehöriges vitales Tumorgewebe, bei bereits zugrundegegangenen Zellkernen.

Zusätzlich ist bekannt, daß akute Nekrosen von Karzinomen CEA-Titererhöhungen verursachen können. Solche Anstiege wurden bei Tumorzellzerfall unter Chemotherapie (Krieger et al. 1983) sowie nach operativer Manipulation am Tumor (Zamscheck 1980, Quayle 1982) gesehen.

Andererseits fiel auf, daß CEA-negative Karzinome in der vorliegenden Arbeit immer normale Serumspiegel hat-

ten, wie auch von Goslin und Mitarbeitern (1980) beobachtet wurde. Die Annahme, daß hohe CEA-Serumwerte durch rasche zelluläre Ausschleusungsmechanismen - und somit möglicherweise immunhistochemisch negativem Karzinom - entstehen würden, konnte somit nicht bestätigt werden.

Es ergibt sich also, bei differenzierter Betrachtung, eine gewissen K o r r e l a t i o n zwischen C E A - I m m u n h i s t o c h e m i e und dem C E A - S e r u m s p i e g e l. Erhöhte Titer finden sich demnach bei Patienten mit deutlich positiver immunhistochemischer Reaktion und dem gleichzeitigen Nachweis von ZN-Arealen in der Nachbarschaft vom Bindegewebe, während bei Patienten mit negativer CEA-Immunhistochemie eher normale Titer zu erwarten wären.

6. ZUSAMMENFASSUNG

65 Operationspräparate kolorektaler Karzinome aus dem Pathol. Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München wurden zufällig ausgewählt und immunhistochemisch untersucht.

Dabei wurde die indirekte Immunperoxidase-Methode angewandt, bei der zunächst ein gegen das interessierende Antigen gerichteter erster Antikörper (hier: IgG vom Kaninchen) und dann ein mit dem Enzym "Peroxidase" gekoppelter zweiter Antikörper (hier: Ziege-Anti-Kaninchen) eingesetzt wird, der sich an den ersten Antikörper anlagert. In einem weiteren Schritt wird durch das Enzym eine Farbreaktion (hier: 3-Amino-9-Äthyl-Carbazol) katalysiert, wodurch das nachzuweisende Antigen optisch sichtbar wird.

Mit entsprechenden polyklonalen Antikörpern wurden die drei tumorassoziierten Antigene "Carcinoembryonic Antigen" (CEA), "Nonspecific Cross-reacting Antigen" (NCA) und "Tissue Polypeptide Antigen" (TPA) an formalinfixiertem und paraffineingebettetem Material dargestellt. Dabei wurden je Tumorfall und Antigen der Resektionsrand (normale Mukosa), die an den Tumor angrenzende noch gesunde Schleimhaut (adjacent mucosa) und am Tumor Randbereich, Zentrum und Invasionsfront nach Reaktionstyp und Reaktionsintensität bewertet. Für CEA wurden zusätzlich die zellfrei-nekrotischen (ZN)-Areale planimetrisch-rechnergestützt ausgemessen.

Bei 33 Fällen war ein präoperativer CEA-Serumspiegel bekannt, für 29 davon lag eine Messung der CEA-Antigendichte mit der Durchflußzytometrie vor.

Ziel der Arbeit war es folgende Fragestellungen zu bearbeiten:

- Besteht ein Zusammenhang zwischen histopathologischen und immunhistochemischen Eigenschaften?

- Unterscheiden sich hier die drei tumorassoziierten Antigene?
- Kann NCA als immunologisch verwandtes Antigen zu CEA bzw. kann TPA als nicht immunologisch verwandtes Antigen zu CEA die Aussagemöglichkeiten bei Fragen zum kolorektalen Karzinom erweitern?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen präoperativen Serumspiegeln von CEA und immunhistochemischen Befunden?

Zunächst wurde immunhistochemisch nachgewiesen, daß ein kommerziell erhältliches aCEA-Antiserum (Fa. Dakopatts) erst nach Absorption an Lungengewebe nicht mehr mit NCA kreuzreagierte. Nur das absorbierte Antiserum konnte weiterverwendet werden.

Für CEA wurde in der normalen Mucosa ein Luminaltyp als Normalbefund angesehen. Nur in einzelnen Epithelzellen war eine zytoplasmatische Reaktion mit feingranulärer Verteilung vorhanden. Das letztgenannte Muster war aber bei zunehmender Entdifferenzierung in den Tumoren gehäuft nachweisbar, bei gleichzeitiger Abnahme des Luminaltyps. Mit zunehmender Entdifferenzierung war gleichfalls eine Abnahme der Reaktionsintensität und das Auftreten nicht reagierender Tumoren zu beobachten.

Stark reagierendes CEA-positives Material war vor allem in zellfrei-nekrotischen (ZN)-Arealen zu sehen. Trotz fehlender Kerndarstellbarkeit blieb das Reaktionsmuster in solchen Bezirken ähnlich wie in vitalen Arealen, teilweise nahm die Reaktionsintensität sogar zu.

Die Messungen der Tumorzellen mit der Durchflußzytometrie stimmten sehr gut mit den immunhistochemischen Befunden überein.

Der auffälligste Befund für NCA war eine sehr konstante Verteilung der Reaktionstypen, die denen von CEA entsprachen, sowohl in der gesunden und adjacent mucosa als auch in den Tumoren aller Differenzierungsgrade.

Im Unterschied zu CEA war der Zytoplasmatyp häufiger, wobei NCA nicht diffus in der Zelle lag, sondern zu kleinen Ringen kondensiert war.

TPA zeigte in der gesunden Schleimhaut häufig einen Membrantyp, seltener einen Zytoplasmatyp mit retikulärer Zeichnung. Dieser war aber bei G 2- und mehr noch bei G3-Karzinomen sehr häufig anzutreffen.

Entdifferenzierte Tumoren reagierten in der Regel schwächer als gut differenzierte, im Unterschied zu CEA und NCA gab es aber bei TPA keine negativen Tumoren.

Durch ein diskutiertes "dualistisches" Verhalten von G 3-Karzinomen ließen sich einander bisher widersprechende Befunde von verschiedenen Autoren bezüglich der CEA-Reaktivität bei diesen Karzinomen gut erklären.

Die Verhältnisse bei zunehmender Tumordinvasion entsprachen in etwa denen bei steigendem Malignitätsgrad. Ganz anders als bei CEA nahm bei TPA die Reaktionsintensität mit zunehmender Nekrotisierung stark ab.

Eine sehr starke Intensität war bei der Darstellung der Tumoren mit aTPA bei infiltrierenden Einzelzellen und an der vordersten Linie der Invasionsfront zu beobachten. Dieser Befund und die retikuläre Feinstruktur von TPA entsprechen gut der Funktion dieses Antigens als Zytokeratin.

Eine signifikante Abhängigkeit konnte für den CEA-Serumspiegel von der Reaktionsintensität, vom Grad der Tumordinvasion und vor allem von der Größe von ZN-Arealen an der Invasionsfront der Tumoren gezeigt werden.

Als praktische Konsequenzen der vorliegenden Arbeit könnten sich somit folgende Punkte anführen lassen:

1. Von allen histopathologischen Parametern korrelierte das "Tumorigrading" am besten mit der immunhistochemischen Reaktionsintensität und dem Reaktionsmuster. Intensitätsgrad und Verteilung hingen also für CEA, NCA und TPA am ehesten von Differenzierungsvorgängen ab.
2. CEA war nicht in allen kolorektalen Karzinomen positiv. NCA hatte eine noch höhere Rate negativer Fälle. TPA war dagegen in allen Fällen positiv. Der Bestimmung von TPA beim kolorektalen Karzinom sowohl im Serum als auch mit der Immunhistochemie sollte daher vermehrte Aufmerksamkeit geschenkt werden.
3. NCA war in seinem immunologischen Verhalten sehr stabil über alle histopathologischen Parameter. Es ist deshalb zur Klärung bestimmter Fragestellungen (z.B. Differenzierungsmuster) weniger geeignet als CEA und TPA, die hier variabler reagierten.
4. TPA war auch noch bei entdifferenzierten Kolonkarzinomen positiv. Dies könnte differentialdiagnostische Hilfestellungen bei der Abklärung unbekannter entdifferenzierter Tumoren geben.
5. Bei differenzierter Betrachtung ergibt sich eine Korrelation von immunhistochemischen Befunden mit aCEA und dem CEA-Serumspiegel. Insbesondere ein hoher Anteil von zellfrei-nekrotischen Arealen in der Nähe von Bindegewebe ist eine (Teil)-Ursache für einen erhöhten CEA-Serumspiegel.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Abelev G.I., Perova S.D., Khramkova N.I., Postnikova Z.A., Irlin I.S.:

Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatoma.

Transplantation 1, 174, 1963

Ahnen D., Nakane P., Brown W.:

Ultrastructural localization of carcinoembryonic antigen in normal intestine and colon cancer.

Cancer 49, 2077, 1982

Alastair D., Simmons R., Perlmann P.:

Carcinoembryonic antigen and blood group substances.

Cancer Res. 33, 313, 1973

Björklund B.:

Antigenicity of malignant and normal human tissues by gel diffusion techniques.

Int. Arch. Allergy. appl. Immun. 8, 179, 1956

Björklund B., Björklund V.: Antigenicity of pooled human malignant and normal tissues by cytoimmunological technique. Presence of an insoluble, heat-labile tumor antigen.

Int. Arch. Allergy. appl. Immun. 10, 153, 1957

Björklund B.:

Tissue polypeptide antigen, review and recent progress
In: Critical evaluation of tumor markers.

Contr. Oncol. Vol.7, p. 73, Karger, Basel, 1981

Björklund B.:

Overview of TPA: specificity, immunochemistry and biological basis. Manuscript submitted to the XXXIst Colloq., Protides of the Biological Fluids, Brussels, Belgium, 2-5 May 1983

Björklund V., Björklund B.:

Lokalization of synthesis of TPA in normal and malignant tissues by immunological techniques.

In: H. Peeters: Protides of Biol. Fluids, 27th Colloq., p. 73, Pergamon Press Oxford and New York, 1979

Björklund V., Björklund B., Wittekind C., v.Kleist S.:

Immuno-histochemical localization of tissue polypeptide antigen (TPA) and carcino-embryonic antigen (CEA) in breast cancer.

Acta. path. microbiol. immunol. scand. Sect. A, 90, 471, 1982

Björklund V., Björklund B.:

Immunohistochemistry of TPA: notes on the methodology.

Manuscript submitted to the XXXIst Colloquium, Protides of Biological Fluids, Brussels, Belgium, 2-5 May, 1983

Booth S.N., King J.P.G., Leonhard J.C., Dykes P.W.:

The significance of elevation of serum carcino-embryonic antigen (CEA) levels in inflammatory diseases of the intestine.

Scand. J. Gastroenterology 9, 651, 1974

Bordes M., Michiels R. and Martin F.:

Detection by immunofluorescence of carcinoembryonic antigen in colonic carcinoma, other malignant or benign tumours and non-cancerous tissues.

Digestion 9, 106, 1973

Boyd C., Bivens B., Kashmiri R., Parker J., Meeker W.:

Plasma CEA, tumor CEA and tumor histology.

J. Surg. Oncol. 8, 507, 1976

Burns J.:

Background staining and sensivity of unlabelled anti-body- enzyme (PAP) method. Comparison with the peroxidase labelled antibody sandwich method using formalin fixed paraffin embedded material.

Histochemistry 43, 291, 1975

Burstone M.S.:

Histochemical demonstration of cytochromeoxidase with new amine reagents.

J. Histochem. Cytochem. 8, 63, 1960

Burtin P., Chavanel G., Hirsch-Marie H.:

Characterization of a second normal antigen, that cross-reacts with CEA.

J. Immunol. 111, 1926, 1973 (a)

Burtin P., v. Kleist S., Sabine M.C., King M.:

Immunohistological localization of carcinoembryonic antigen and nonspecific cross-reacting antigen in gastrointestinal normal and tumoral tissues.

Cancer Res. 33,3299,1973 (b)

Burtin P.:

Membrane antigens of the colonic tumors.

Cancer 34, 829, 1974

Burtin P., Quan P.C., Sabine M.C.:

Nonspecific crossreacting antigen as a marker for human polymorphs, macrophages and monocytes.

Nature 255, 714, 1975

Campbell R.C.:

Statische Methoden für Biologie und Medizin.

Thieme, Stuttgart, 1971

Castelli M., Colizza S., Segal F., Segal E.:
Plasma and tissue CEA assays and their clinical usefulness in colorectal cancer patients.

J. Exp. Clin. Cancer Res., Suppl. 2, 18, 1983

Coligan J.E., Henkart P.A., Todd C.W., Terry W.D.:
Heterogeneity of the carcinoembryonic antigen.

Immunochemistry 10, 591, 1973

Coligan J.E., Egan M., Guyer R.L., Schnute W.C., Todd C.W.:

Structural studies on the carcinoembryonic antigen.

Ann. Acad. Sci. 259, 355, 1975

Csaszar H., Wagener C., Breuer H.:

A highly sensitive method for the immunohistochemical detection of carcinoembryonic antigen.

Fresenius Z. Anal. Chem. 290, 136, 1978

Dakopatts:

Information on Dakopatts anti-carcinoembryonic antigen (CEA).

Dakopatts, Copenhagen, 1981

Darcy D.A., Tuberville C., James R.:

Immunological study of carcinoembryonic antigen (CEA) and a related glycoprotein.

Brit. J. Cancer 28, 14, 1973

Dawson P.A., Filipe I.M.:

An ultrastructural and histochemical study of the mucous membrane adjacent to and remote from carcinoma of the colon.

Cancer 37, 2388, 1976

Denk H., Tappeiner G., Eckerstorfer R., Holzner J.H.:
Carcinoembryonic antigen (CEA) in gastrointestinal and
extragastrointestinal tumors and its relation to
tumor-cell differentiation.

Int. J. Cancer 10, 262, 1972

Dent P., Carrel S., Mach J-P.:

Detection of new cross-reacting carcinoembryonic
antigen(s) on cultured cells by mixed hemadsorption
assay.

J. Natl. Cancer Inst. 64, 309, 1980

Drewinko B., Yang L-Y.:

Observations on the synthesis of carcinoembryonic
antigen by an established human colonic carcinoma cell
line.

Oncology 37, 89, 1980

Dukes C.E.:

The classification of cancer of the rectum.

J. Path. Bact. (Edinb.) 35, 323, 1932

Dyce B., Haverback B.:

Free and bound carcinoembryonic antigen in neoplasms in
normal adult and fetal tissue.

Immunochemistry 11, 423, 1974

Eder M.:

Zellerneuerung am Magendarmtrakt.

Verh. dtsch. Ges. Path. 50, 75, 1966

Eder M.:

Epidemiologie und Pathologische Anatomie des Dickdarm-
karzinoms

In: Die Gastroenterologische Reihe, Gastrointestinale
Tumoren I, p.9, Kali-Chemie Pharma GmbH, Hannover, 1978

Filipe M.I., Branfoot A.C.:

Abnormal patterns of mucus secretion in apparently normal mucosa of large intestine with carcinoma.
Cancer 34, 282, 1974

Filipe M.I., Abbas S., Greaves P.:

Mucin composition and CEA content in assessing malignant potential of colonic adenomas.
VIIIth European Congress of Pathology, p. 22,
Helsinki, 1981

Fritsche R., Mach J-P.:

Isolation and characterization of carcinoembryonic antigen (CEA) extracted from normal human colon mucosa.
Immunochimistry 14, 119, 1977

Gadler H., Bremme K., Wahren B.:

Distribution of tumor associated antigen CEA and crossreacting NCA in fetal organs.
Int. J. Cancer 25, 91, 1980

Gibbs N.M.:

Histological typing of intestinal tumours (WHO) with particular reference to epithelial tumours of the colon,
In: Grundmann E., Cancer Campaign Vol. 2, Colon Cancer:
p. 113, Fischer, Stuttgart, New York 1978

Go V., Spencer R., Ravry M.J., Shorter R., Huizenga K.:

Carcinoembryonic antigen (CEA) in malignant and inflammatory colonic tissue.
Gastroenterology 64, 734, 1973

Gold P., Freedman S.:

Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques.
J. exp. Med. 121, 439, 1965

Gold P., Freedman S.O.:

Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system.

J. exp. Med. 122, 467, 1965

Gold P., Gold M., Freedman S.O.:

Cellular location of carcinoembryonic antigens of the human digestive system.

Cancer Res. 28, 1331, 1968

Gold P., Krupey J., Ansari H.:

Position of the carcinoembryonic antigen of the human digestive system in ultrastructure of tumour cell surface.

J. Natl. Cancer Inst. 45, 219, 1970

Goldenberg D.M., Sharkey R., Primus F.:

Carcinoembryonic antigen in histopathology: immunoperoxidase staining of conventional tissue sections.

J. Natl. Cancer Inst. 57, 11, 1976

Goldenberg D.M., Neville A.M., Carter A.C., Go V., Holyoke E.D., Isselbacher K., Schein P., Schwartz M.:
CEA (Carcinoembryonic Antigen): Its role as a marker in the management of cancer.

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 101, 239, 1981

Goslin R.H., O'Brien M.J., Steele G.D.:

CEA tissue staining and plasma levels in poorly differentiated colorectal cancer.

Clin. Res. Abstr. 28, 629 A, 1980

Graham R.C., Lundholm U., Karnovsky M.J.:

Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole

J. Histochem. Cytochem. 13, 150, 1965

Hammarström S., Engvall E., Sundblad G.:
Carcinoembryonic antigen (CEA). Purification structure
and antigenetic properties.

In: Boström H., Larson E., Ljungstedt M.:
Health control in detection of cancer, p. 24,
Almquist and Wiksell, Stockholm, 1976

Hansen H.J., Snyder J., Miller E., Vandevoorde J.P.,
Miller O.N., Hines L., Burns J.J.:
Carcinoembryonic antigen (CEA) assay. A laboratory
adjunct in the diagnosis and management of cancer.
Hum. Path. 5, 139, 1974

Herberman R., Aoki T., Liu M., Sturm M.:
Location by immunoelectron microscopy of carinoem-
bryonic antigen on cultured adenocarcinoma cells.
J. Natl. Cancer Inst. 55, 797, 1975

Herrera M., Chu T.M., Holyoke E.D.:
Carcinoembryonic antigen (CEA) as a prognostic and
monitoring test in clinically complete resection of
colorectal carcinoma.
Ann. Surg. 183, 5, 1976

Heyderman E., Neville A.M.:
A shorter immunoperoxidase technique for the demonstra-
tion of carcinoembryonic antigen and other cell products.
J. Clin. Path. 30, 138, 1977

Hirschfeld L., Halber V., Rosenblatt J.:
Untersuchungen über Verwandtschaftsreaktionen zwischen
Embryonal- und Krebsgewebe (II). Menschenembryo und
Menschenkrebs.
Z. Immunitätsforsch. 75, 209, 1932

Huang S.N.:

Immunohistochemical demonstration of hepatitis B core and surface antigens in paraffin sections.

Lab. Invest. 33, 88, 1975

Huitric E., Laumonier R., Burtin P., v.Kleist S.,
Chavanel G.:

An optical and ultrastructural study of the localization of carcinoembryonic antigen in normal and cancerous human rectocolonic mucosa.

Lab. Invest. 34, 97, 1976

Isaacson P., LeVann P.:

The demonstration of carcinoembryonic antigen in colorectal carcinoma and colonic polyps using an immunoperoxidase technique.

Cancer 38, 1348, 1976

Khoo S., Warner N., Lie J., Mackay I.:

Carcinoembryonic antigenetic activity of tissue extracts: a quantitative study of malignant and benign neoplasms, cirrhotic liver, normal adult and fetal organs.

Int. J. Cancer 11, 681, 1973

Kleist S. von , Chavanel G., Burtin P.:

Identification of a normal antigen that crossreacts with the carcinoembryonic antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69, 2492, 1972

Kleist S. von:

Substances immunologically related to CEA.

Ann. Immunol. Inst. Pasteur 124 C, 589, 1973

Kleist S. von, Troupel S., King M., Burtin P.:

A clinical comparison between non-specific cross-reacting antigen (NCA) und CEA in patients' sera.

Brit. J. Cancer 35, 875, 1977

Kleist S. von, King M., Havemann K.:
Demonstration of antibodies in patients' sera directed
against non-specific crossreacting antigen.
J. Natl. Cancer Inst. 61, 1385, 1978

Kleist S. von:
Das karzinoembryonale Antigen (CEA) biologische Grund-
lagen und klinische Anwendung.
Schattauer, Stuttgart-New York, 1983

Krieger G., Wander H.E., Prangen M., Bandlow G., Beyer
J., Nagel G.A.:
Bestimmung des carcinoembryonalen Antigens (CEA) zur
Voraussage des Therapieerfolges beim metastasierenden
Mammakarzinom.
Dtsch. med. Wschr. 108, 610, 1983

Lamerz R., Fateh-Moghadam A.:
Carcinofetale Antigene, II. Carcinoembryonales Antigen.
Klin. Wschr. 53, 193, 1975

Lamerz R., Ruider H.:
Zur Bestimmung des carcinoembryonalen Antigens: Erfah-
rungen mit einem neuen Radioimmunoassay.
Z. Anal. Chem. 279, 105, 1976

Leatham A., Watts G., Atkins N.:
Controlling antisera in immunohistochemistry.
J. Clin. Pathol. 34, 226, 1981

Lewis J., Keep P.A.:
Relationship of serum CEA levels to tumour size and CEA
content in nude mice bearing colonic-tumour xenografts.
Br. J. Cancer 44, 381, 1981

Lillie R.D., Pizzolato P.:

Histochemical use of borohydrides as aldehyde blocking reagents.

Stain. Technol. 47, 13, 1972

Lüning B., Wiklund B., Redelius P., Björklund B.:

Biochemical properties of tissue polypeptide antigen (TPA).

Biochim. biophys. Acta 624, 90, 1980

Lüthgens M., Schlegel G.:

Verlaufskontrolle mit TPA und CEA in der radioonkologischen Nachsorge und Therapie.

Tumor Diagnostik 2, 179, 1981

Mach J.P., Pusztaszzeri G.:

Carcinoembryonic antigen (CEA): Demonstration of a partial identity between CEA and a normal glycoprotein.

Immunochemistry 9, 1031, 1972

Martin F., Martin M.S., Bordes M., Bourdeaux C.:

The specificity of carcino-fetal antigens of the human digestive- tract tumours.

Eur. J. Cancer 8, 315, 1972

Martin E.W., Kibbey W.E., Di Vecchia L., Anderson G.,

Catalano Ph., Minton J.P.:

Carcinoembryonic antigen: clinical and historical aspects.

Cancer 37, 62, 1976

McCartney W.H., Hoffer P.B.:

The value of carcinoembryonic antigen (CEA) as an adjunct to the radiological colon examination in the diagnosis of malignancy.

Radiology 111, 325, 1974

Meryn S., Francesconi M., Abel B.:

Carcinoembryonales Antigen (CEA) and Tennessse Antigen (TAG) in der Tumordiagnostik des Gastrointestinaltraktes. Tumor Diagnostik 4, 101, 1983

Molnar I.G., Vandevoorde, J.P., Gitnick G.L.:

CEA levels in fluids bathing gastrointestinal tumors. Gastroenterology 70, 513, 1976

Morson B.C., Sobin L.H.:

Histological typing of intestinal tumours.

In : WHO international histological classification of tumours No 15, p. 13 (grading), p. 56 (histol. typing). World Health Organization, Genf, 1976

Nakane P.K., Pierce G.B.:

Enzym-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens.

J. Histochem. Cytochem. 14, 929, 1966

Nap M., Ten Hoor K., Fleuren G-J.:

Cross-reactivity with normal antigens in commercial anti-CEA sera, used for immunohistology. The need for tissue controls and absorptions.

Am. J. Clin. Pathol. 79, 25, 1983

Nathrath W.B.J., Meister P.:

Lysozyme and α_1 -anti-chymotrypsin as immunohistochemical tumour markers.

Acta histochemica, Supp. XXV, 69, 1982

Nathrath W.B.J., Arnholdt H., Wilson P.D.:

Keratin, luminal epithelial antigen and carcinoembryonic antigen in human urinary bladder carcinomas.

Path. Res. Pract. 175, 299, 1982

Nathrath W.B.J., Heidenkummer P., Björklund V.,
Björklund B.:

Distribution of tissue polypeptide antigen (TPA) in
normal human tissues: Immunohistochemical study on
unfixed, methanol-, ethanol and formalin fixed tissues.
J. Histochem. Cytochem. 33, 99, 1985

Newman E.S., Petras S.E., Georgiadis A., Hansen J.H.:
Interrelationship of carcinoembryonic antigen and colon
carinoma antigen-III.
Cancer Res. 34, 2125, 1974

O'Brien M.J., Zamcheck N., Burke B., Kirkham S., Sara-
vis C.A., Gottlieb L.S.:
Immunocytochemical localization of carcinoembryonic
antigen in benign and malignant colorectal tissues.
Am. J. Clin. Pathol. 75, 283, 1981

Orjasaeter H.:

Demonstration of carcinoembryonic antigen (CEA), non-
specific cross- reacting antigen (NCA) and an associated
alpha-protein in normal human tissues and fluids by
immunodiffusion techniques.
Acta path. microbiol. scan. (Sect.B) 82, 387, 1974

Pihl E., Naughtan J., Ma J., Ward H.A., Nairn R.C.:
Immunohistological patterns of carcinoembryonic antigen
in colorectal carcinomas. Correlation with staging and
blood levels.
Pathology 12, 7, 1980

Primus F.J., Wang R., Sharkey R., Goldenberg D.:
Detection of carcinoembryonic antigen in tissue sections
by immunoperoxidase.
J. Immunol. Meth. 8, 267, 1975

Primus F.J., Sharkey R., Hansen H.J., Goldenberg D.:
Immunoperoxidase detection of carcinoembryonic antigen.
Cancer 42, 1540, 1978

Primus F.J., Kuhns W.J., Goldenberg D.M.:
Immunological heterogeneity of carcinoembryonic antigen:
immunohistochemical detection of carcinoembryonic anti-
gen determinants in colonic tumors with monoclonal
antibodies.
Cancer Res. 43, 693, 1983

Quayle J.B.:
Tumour lysis as a factor affecting blood levels of CEA.
Br. J. Cancer 46, 213, 1982

Rogalsky V.Y.:
Variations in carcinoembryonic antigen lokalization in
tumours of the colon.
J. Natl. Cancer Inst. 54, 1061, 1975

Rogers G.T., Searle F., Wass M.:
Immunological and chemical studies on sub-fractions of
carcinoembryonic antigen.
Immunochemistry 12, 839, 1975

Rognum T.O., Elgjo K., Brandtzaeg P., Orjasaeter H.,
Bergan A.:
Plasma carcinoembryonic antigen concentrations and
immunohistochemical patterns of epithelial marker
antigens in patients with large bowel carcinoma.
J. Clin. Pathol. 35, 922, 1982 (a)

Rognum T.O., Thorud E., Elgjo K., Brandtzaeg P.,
Orjasaeter H., Nygaard K.:
Large-bowel carcinomas with different ploidy, related
to secretory component, IgA, and CEA in epithelium and
plasma.
Br. J. Cancer 45, 921, 1982 (b)

Sachs L.:

Statistische Methoden.

Springer, Berlin, 1982

Schaefer H.E., Fischer R.:

Der Peroxidasenachweis an Ausstrichpräparaten sowie an Gewebsschnitten nach Entkalkung und Paraffineinbettung.

Klin. Wochenschr. 46, 1228, 1968

Sharkey M., Primus F.J., Goldenberg D.M.:

Comparison of the sensitivity of the indirect, antibody-conjugated and the triple-bridge immunoperoxidase methods for immunohistochemical detection of carcino-embryonic antigen.

Histochemistry 66, 35, 1980

Staab H.J., Anderer F.A.:

Growth of human colonic adenocarcinoma and development of serum CEA in athymic mice. I: strict correlation of tumour size and mass with CEA concentration during logarithmic growth.

Br. J. Cancer 46 (6), 841, 1982

Sternberger L.A.:

Immunocytochemistry.

Wiley Medical Publication, New York, 1979

Svenberg T.:

Carcinoembryonic antigen-like substances of human bile. Isolation and partial characterization.

Int. J. Cancer 17, 588, 1976

Sevenberg T., Hammarström S., Zeromski J.:

Immunofluorescence studies on the occurrence and localization of the CEA-related biliary glycoprotein 1 (BGP 1) in normal human gastrointestinal tissues.

Clin. Exp. Immunol. 36, 436, 1979

Taylor C.R.:

Immunoperoxidase techniques

Arch. Pathol. Lab. Med. 102, 113, 1978

Tuberville C., Darcy D.A., Laurence D.J.R., Johns E.W.
Neville M.:

Studies on carcinoembryonic antigen (CEA) and a related
glycoprotein, CCEA-2. Preparation and chemical characterisation.

Immunochemistry 10, 841, 1973

UICC Committee (Hrsg):

TNM-Klassifikation der malignen Tumoren.

Springer Berlin, Heidelberg, New York, 1979

Valet G., Rüssmann L., Wirsching R.:

Automated flow-cytometric identification of colorectal
tumour cells by simultaneous DNA, CEA-antibody and cell
volume measurement.

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22, 935, 1984

Wagener C., Breuer H.:

Diagnostic, significance and clinical application of
tumor-associated antigens in man with special reference
to the carcinoembryonic antigen.

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15, 529, 1977

Wagener C., Müller R.:

Tumour growth and differentiation in relation to the
content of carcinoembryonic antigen in gastrointestinal
neoplasia.

Fesenius Z. Anal. Chem. 290, 137, 1978

Wagener C., Csaszar H., Totovic V., Breuer H.:

A highly sensitive method for the demonstration of car-
cinoembryonic antigen in normal and neoplastic colonic
tissue.

Histochemistry 58, 1, 1978

Wagener C., Hain F., Breuer H., Olude S., Cremer H.,
Müller-Walraf R.:

Immunohistochemical demonstration of carcinoembryonic
antigen in normal, transitional and inflamed colonic
mucosa.

Oncodevel. Biol. Med., 2, 331, 1981 (a)

Wagener C., Müller-Wallraf R., Nisson S., Gröner J.,
Breuer H.:

Lokalization and concentration of carcinoembryonic anti-
gen (CEA) in gastrointestinal tumors: correlation with
CEA levels in plasma.

J. Natl. Cancer Inst. 67 (3), 559, 1981 (b)

Wagener C.:

Wie zuverlässig ist die Bestimmung des carcinoembryona-
len Antigens?

Dtsch. med. Wschr. 108, 607, 1983

Wagener C., Hain F., Breuer H.:

Localisation of carcinoembryonic antigen in embryonic
and fetal human tissues.

Histochemistry 78, 1, 1983

Wahren B., Gahrton G., Hammarström S.:

Nonspecific cross-reacting antigen in normal and leukemic
myeloid cells and serum of leukemic patients.

Cancer Res. 40, 2039, 1980

Wahren B., Gahrton G., Ruden U., Hammarström S.:

Clinical evaluation of NCA in patients with chronic myelocy-
tic leucemia.

Int. J. Cancer 29, 133, 1982

Weber K., Osborn M., Moll R., Wiklund B. und Lüning B.:
Tissue polypeptide antigen (TPA) is related to the non-epidermal keratins 8, 18 and 19 typical of simple and non-squamous epithelia: re-evaluation of a human tumor marker.

The EMBO Journal 3, 2707, 1984

Wiebecke B., Krey U., Löhrs U., Eder M.:

Morphological and autoradiographical investigations on experimental carcinogenesis and polyp. development in the intestinal tract of rats and mice.

Virchows Arch. (A) Path. Anat. 360, 179, 1973

Wiebecke B., Brandts, A., Eder M.:

Epithelial proliferation and morphogenesis of hypoplastic adenomatous and villous polyps of the human colon.

Virchows Arch.(A) Path. Anat. 364, 35, 1974

Wiggers T., Arends J.W., Thijs C.D., Jeekel J.,

Greep J.M.:

CEA in patients with colorectal carcinoma. Correlation of CEA blood levels and histopathology.

J. Exp. Clin. Cancer Res., Suppl. 2, 35, 1983

Wiklund B., Lüning B., Björklund B.:

Immunological properties of TPA: specific antigenetic determinant of subunit B₁.

Acta Chem. Scand. (B) 35, 325, 1981

Wirsching R.:

Durchflußzytometrische Analyse gastrointestinaler Karzinome.

Habil. Schrift, Ludwig-Maximilians-Universität München, 1984

Witting C.:

Immunofluorescence studies on formalin-fixed and paraffin-embedded material.

Beitr. Path., 161, 288, 1977

Zamcheck N.:

The present status of CEA in diagnosis, prognosis and evaluation of therapie.

Cancer 36, 2460, 1975

Zamcheck N., Doos W., Prudents R., Lurie B., Gottlieb L.:

Prognostic factors in colon carcinoma. Correlation of serum carcinoembryonic antigen level and tumor histopathology.

Human Path. 6, 31, 1975

Zamcheck N.:

Serial CEA determination in management of colo-rectal cancer: update. In: Grundmann E.: Cancer Campaign Vol 2: Colon Cancer. p. 149, Gustav Fischer , Stuttgart-New York 1978

Zamcheck N.:

Current status of CEA.

In: Winawer S., Schottenfeld D., Sherlock P.:

Colorectal Cancer: Prevention, Epidemiology and Screening, p. 140, Raven Press, New York, 1980

L E B E N S L A U F

Name: Reinhart Schüppel
geboren: 17. März 1957
in: München
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Konfession: evang.-luth.

Schulbildung: 1963 - 1967 Grundschule Starnberg
1967 - 1976 Gymnasium Starnberg
1976 Abitur

Hochschulstudium: Studium der Agrarwissenschaften:
1976 - 1978 Technische Universität
München/Weihenstephan

Studium der Medizin:
1978 - 1985 Ludwig-Maximilians-
Universität München

1980 Ärztliche Vorprüfung,
1981 Ärztliche Prüfung, 1. Abschnitt
1984 Ärztliche Prüfung, 2. Abschnitt
1985 Ärztliche Prüfung, 3. Abschnitt
Ärztliche Approbation Juni 1985



Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Wiebecke für die hervorragende Betreuung und die vielen richtungsweisenden Anregungen, die in die vorliegende Arbeit eingeflossen sind.

Viemals möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Eder danken für die herzliche Aufnahme und die Möglichkeit an seinem Institut zu promovieren.

Herrn Prof. Dr. Lamerz möchte ich für die Überlassung und Reinigung von Antiseren und für die zahlreichen wertvollen Hinweise vielmals danken.

Dank schulde ich auch Herrn Prof. Dr. Björklund für das TPA-Antiserum.

Für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und die Überlassung statistischer Ergebnisse möchte ich mich bei Herrn Priv. Doz. Dr. Wirsching bedanken.

Besonderen Dank an Herrn Dr. Nathrath für die zahlreichen methodischen und inhaltlichen Hinweise.

Mein Dank gilt auch Frl. Vaupel für die zuverlässige Unterstützung im Labor und Frau Tränkel für das Schreiben des Manuskripts.

